

**VERSUCHE ZUR ISOLIERUNG
VON ORGAN-KALLIKREINEN DURCH
AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE**

Martin Müller

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553803_0103

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Universität München

VERSUCHE ZUR ISOLIERUNG VON ORGAN-KALLIKREINEN DURCH
AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
vorgelegt von

MARTIN MÜLLER

München 1972

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter:	Priv.Do. Dr. Fritz
Mitberichterstatter:	Priv.Do. Dr. Hochstrasser
Dekan:	Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 1972



INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG

B. THEORETISCHER TEIL

I. Das Kallikrein-Kinin-System

1. Zur Biochemie des Kallikrein-Kinin-Systems
2. Bemerkungen zur Pharmakologie und zu Problemen der Physiologie und Pathophysiologie des Kallikrein-Kinin-Systems
3. Natürliche Inhibitoren der Kallikreine

II. Der polyvalente Proteinase-Inhibitor aus Rinderorganen

1. Vorkommen
2. Zur Biochemie des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors
3. Erläuterung pathophysiologischer Vorgänge bei Schock und Entzündung und der pharmakologischen Wirkung des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors
4. Therapeutische Anwendung des Trypsin-Kallikrein-Inhib.

III. Bisherige Isolierungsverfahren für Pankreas- und Submandibularis-Kallikrein

IV. Die Affinitätschromatographie

C. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Definitionen

1. Enzym-Einheit
2. Biologische Kallikrein-Einheit
3. Kallikrein-Inhibitor-Einheit
4. Inhibitor-Einheit

II. Standardmethoden

1. Bestimmung der Kallikrein-Aktivität
 - a. Enzymatische Methode
 - b. Biologische Methode
2. Bestimmung der Trypsin- bzw. Plasmin-Aktivität
3. Bestimmung der Chymotrypsin-Aktivität
4. Bestimmung der Aktivität des nativen bzw. guanidi-
nierten TK-Inhibitors
 - a. Quantitativer Nachweis der Hemmung von Kallikrein
 - b. Quantitativer Nachweis der Hemmung von Trypsin
5. Sephadex-Gelfiltration
6. Automatische Aminosäureanalyse

III. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

1. Herstellung und Charakterisierung von guanidinierten
TK-Inhibitor und wasserunlöslichen Inhibitorharzen
 - a. Guanidiniierung des TK-Inhibitors
 - b. Entsalzung und Fraktionierung des guanidinier-
ten TK-Inhibitors an Sephadex G-25
 - c. Aminosäureanalyse des guanidin. TK-Inhibitors
 - d. Herstellung wasserunlöslicher Derivate des guani-
dinierten TK-Inhibitors
 - aa. polyamphoteres Inhibitorharz (N-Harz)
 - bb. polyanionisches Inhibitorharz (A-Harz)
 - e. Aminosäureanalyse des N- und A-Harzes
 - f. Bindungs- und Dissoziationsversuch mit Trypsin
 - aa. N-Harz
 - bb. A-Harz
 - g. Bindungs- und Dissoziationsversuch mit Chymotrypsin
 - aa. N-Harz
 - bb. A-Harz
 - h. Bindungs- und Dissoziationsversuch mit Kallikrein
 - aa. N-Harz
 - bb. A-Harz
 - i. Ergebnisse aus den Versuchen 1.d - h

III.

2. Isolierung und Reinigung von Pankreas-Kallikrein des Schweines
 - a. Guanidiniierung des TK-Inhibitors
 - b. Aminosäureanalyse des guanidinierten TK-Inhibitors
 - c. Herstellung eines polyamphoteren Inhibitorharzes
 - d. Affinitätschromatographie an dem wasserunlöslichen Inhibitorharz
 - e. Ergebnisse aus den einzelnen Versuchen mit dem Inhibitorharz
3. Isolierung und Reinigung von Submandibularis-Kallikrein des Schweines
 - a. Ausgangsmaterial
 - b. Affinitätschromatographie an dem wasserunlöslichen Inhibitorharz
 - c. Entsalzung und Fraktionierung an Sephadex G-50 bzw. G-75
 - d. Aminosäureanalyse des gereinigten Submandibularis-Kallikreins
 - e. Ergebnisse aus den Reinigungsversuchen mit dem Inhibitorharz
4. Vergleich der Hemmwirkung des nativen und des guanidinierten TK-Inhibitors gegenüber dem gereinigten Pankreas- bzw. Submandibularis-Kallikrein
 - a. Quantitativer Nachweis der Hemmung von Kallikrein
 - b. Ergebnisse der Hemmkurven

IV. Diskussion

V. Zusammenfassung

VI. Literaturnachweis

ABKÜRZUNGEN

TK-Inhibitor:	Trypsin-Kallikrein-Inhibitor = Trasylol ^R
N-Harz:	Polyamphoterer Inhibitorharz
A-Harz:	Polyanionischer Inhibitorharz
ADH:	Alkohol-Dehydrogenase
BAEE:	Benzoyl-L-arginin-äthylester
BAPNA:	Benzoyl-DL-arginin-p-nitro-anilid
EMA:	Copolymer aus Maleinsäure und Äthylen
NAD:	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
TRA-Puffer	Triäthanolamin-hydrochlorid
E:	Extinktionsänderung
1 KE:	Eine biologische Kallikrein-Einheit
1 U:	1 Unit = Eine Enzymeinheit
1 mU:	1 Milli-Unit
1 mIU:	1 Inhibitor-Milli-Unit

A. E I N L E I T U N G

Zu den humoralen Faktoren, die im Organismus bestimmte Funktionskreise beeinflussen oder steuern, gehört das Kallikrein-Kinin-System. Die Kallikreine setzen enzymatisch aus einer im Blutplasma vorhandenen Vorstufe, dem Kininogen, die Kinine frei. Dieses System ist charakterisiert durch seine pharmakologische Wirkung, wie z.B. die Kontraktion glatter Muskulatur, periphere Gefäßerweiterung und Schmerzerzeugung. Es ist aber noch nicht bekannt, inwieweit diese pharmakologischen Wirkungen zur Regelung physiologischer Funktionen beitragen. Auch die pathophysiologische Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems, z.B. bei Schock und Entzündung, ist noch nicht völlig aufgeklärt.

Es ist verständlich, daß Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Kallikreine und Kinine u.a. die Reindarstellung der Organ-Kallikreine notwendig machen. Bei den bisherigen Isolierungsverfahren ging man nach den üblichen Methoden vor, die bei einer Reindarstellung biologischer Makromoleküle auf der Basis bestimmter physikochemischer Eigenschaften angewendet werden: Ionenaustauschchromatographie (DEAE-Cellulose), Gelchromatographie, Adsorptionschromatographie (Hydroxylapatit), Elektrophorese und Fällung mit organischen Lösungsmitteln und Salzen. Diese Isolierungsverfahren sind aber sehr aufwendig und oft verlustreich. In letzter Zeit wurde ein neues Verfahren entwickelt, das die Isolierung von Enzymen und anderen Makromolekülen auf einfache, rasche und spezifische Weise gestattet, die Affinitätschromatographie.

Voraussetzung der Affinitätschromatographie ist die reversible Komplexbildung eines biologischen Makromoleküls mit einem mehr oder weniger spezifischen "Partner-Molekül", z.B. die Bindung eines Substrates oder des Hemmzentrums eines Inhibitors an das aktive Zentrum eines Enzyms. Gewöhnlich wird bei der Affinitätschromatographie ein wasserunlöslicher Ligand gebildet, d.h. wasserlösliche Moleküle werden kovalent an einen wasserunlöslichen Träger gebunden. Gibt man in einer Säule über dieses Harz eine Lösung, so werden nur die Makromoleküle in der Säule komplex gebunden, die eine hohe Affinität zu dem Liganden

haben. Unter geeigneten Bedingungen wird der gebildete Komplex instabil und das dissoziierte Makromolekül kann gereinigt eluiert werden.

Nach diesem Prinzip wurde bereits früher (FRITZ und Mitarbeiter) der polyvalente Proteinaseinhibitor aus Rinderorganen, das Trasylol^R, an einen wasserunlöslichen Träger gebunden und dann das Enzym Kallikrein isoliert, das Ergebnis war jedoch unbefriedigend.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es nun, ein besseres Verfahren auszuarbeiten, um Organ- Kallikreine durch Affinitätschromatographie zu isolieren und zwar unter Verwendung eines chemisch modifizierten, nämlich des guanidinierten Trypsin-Kallikrein-Inhibitors.

B. T H E O R E T I S C H E R T E I L

I. Das Kallikrein-Kinin-System

1. Zur Biochemie des Kallikrein-Kinin-Systems

Im exokrinen Pankreas (3) wird die Protease Kallikrein als inaktive Vorstufe, als sog. Präkallikrein (1) gebildet, dessen Aktivierung im Duodenum erfolgt (3). Auch im Plasma ist ein Präkallikrein vorhanden (6). In der Magen- und Darmschleimhaut liegt der größte Teil ebenfalls als Proenzym vor (8), während in den Submandibularisdrüsen nach WERLE und VON RODEN Kallikrein nur in aktiver Form vorkommt (2), ebenso im Harn.

Kallikreingehalt im Harn, Serum und verschiedenen Organen des Menschen in KE/ml bzw. KE/g Frischgewebe (nach Aktivierung!):

Harn	0,15 - 0,25
Serum	3 - 4
Pankreas	25
Dickdarm	4,5 - 10
Submand.	2

Die mit Hilfe der Sedimentationskonstanten, der Molekularsiebmethode und der Bausteinanalyse ermittelten Molekulargewichte liegen zwischen 32.800 bei Submandibularis-Kallikrein vom Schwein (WERLE und Mitarbeiter, 11), 33.000 - 35.000 bei Pankreas-Kallikrein vom Schwein (MORIYA, 12, FRITZ, TRAUTSCHOLD, WERLE, 13, 14) und 97.000 bei Serum-Kallikrein vom Schwein (HABERMANN, 15). Das Kallikrein aus Pankreas ist am besten charakterisiert, sein isoelektrischer Punkt liegt zwischen 4,0 und 4,4 (9,10).

Den Kallikreinen gemeinsam ist die hochspezifische proteolytische Aktivität, das natürliche Substrat ist das Kininogen (siehe unten). Die esterolytische Aktivität ist zwar weniger scharf begrenzt, doch werden nur wenige N-substituierte Aminosäureester von Lys und Arg, wie z.B. BAEE gespalten.

Die anfangs den Kallikeinen selbst zugeschriebene hypotensive Wirksamkeit wurde bald als Folge eines enzymatischen Mechanismus erkannt (16). Durch die Kininogenase Kallikrein kommt es im Blutplasma zur Freisetzung der allein wirksamen Kinine, deren inaktive Vorstufe das Kininogen ist.

Kininogen findet sich hauptsächlich im Blutplasma und wird wahrscheinlich in der Leber gebildet (17). Menschliches Kininogen ist ein saures α -Glykoprotein mit einem isoelektrischen Punkt zwischen pH 3,3 und 3,6 (19) und wandert in der Elektrophorese mit den α_2 -Globulinen.

Es sind bisher 3 Kinine isoliert worden, die durch Kallikreine, Trypsin und Schlangengiftproteasen aus nativem Kininogen und peptischen kininliefernden Fragmenten des Kininogens freigelegt werden: man unterscheidet das Nonapeptid Bradykinin oder Kinin 9, das Dekapeptid Kallidin oder Kinin 10 und das Undekapeptid Met-Lys-Bradykinin oder Kinin 11 (20). Die Aminosäurezusammensetzung dieser Kinine ist folgende:

H-Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH

—————Kinin-9—————

—————Kinin-10—————

—————Kinin-11—————

Der Abbau der Kinine - und auch der Kininogenasen im Organismus - erfolgt ebenfalls enzymatisch.

2. Bemerkungen zur Pharmakologie und zu Problemen der Physiologie und Pathophysiologie des Kallikrein-Kinin-Systems

Im Vordergrund der pharmakologischen Effekte der Kinine stehen periphere Vasodilatation, Erregung glatter Muskulatur, Erhöhung der Kapillarpermeabilität und Schmerzerzeugung.

Der durch die Gefäßerweiterung bedingte Blutdruckabfall wird relativ rasch (5-10 Min) normalisiert durch den Kininabbau und die sympathische Gegenregulation (21,22,23). Die Kontraktion glatter Muskulatur ist besonders auffällig am Rattenuterus und Meerschweinchenileum in vitro, in vivo fehlt diese Wirkung häufig (24,25). Eine deutliche bronchokonstriktorische Wirkung beobachtete man nur an der Meerschweinchenlunge (26). Eine signifikante Permeabilitätserhöhung zeigten der Radiogoldtest (27) und der Austritt fluoreszenzmarkierten Plasmaproteins an (28). Eine starke schmerzerzeugende Wirkung findet man bei Applikation von Kininen auf dem Grund einer Cantharidenblase (29,30), nach i.c. Injektion von Bradykinin (31) und gereinigtem Pankreas-Kallikrein (32).

Inwieweit diese pharmakologischen Wirkungen zur Regelung physiologischer Funktionsabläufe beitragen ist nicht geklärt. So nimmt z.B. FREY eine Beteiligung dieses Systems am Zustandekommen der reaktiven Hyperämie an (33), während die Befunde HORTON'S nicht dafür sprechen (34). EFFKEMANN und WERLE konnten in vivo am wehepbereiten Uterus mit Kininlösung Kontraktionen auslösen (35), dagegen zweifeln andere Autoren diese physiologische Wirksamkeit an (BERDE,36).

Eine Ursache für die Diskrepanz zwischen einzelnen Resultaten liegt wahrscheinlich in der biologischen Bestimmungsmethode des Kinins und vor allem der Tatsache, daß die Halbwertszeit der Kinine im Sekundenbereich liegt (51). Auch die Methode der Kininogenbestimmung nach DINIZ und CARVALHO (37), die für pathophysiologische Untersuchungen große Bedeutung hat, ist zunehmender Kritik ausgesetzt (38). Es gibt eine Reihe von Berichten, nach denen verschiedene Schockformen parallel mit dem Blutdruckabfall mit einer Senkung des Kininogenspiegels und damit der Kininliberierung einhergehen: z.B. Endotoxin- und hämorrhagischer Schock (WEBSTER,39, MEYER und WERLE, 42,41), hämorrhagischer Schock nach Verkehrsunfällen (WERLE, 42), anaphylaktischer Schock des Hundes (43). Im Widerspruch dazu stehen Ergebnisse von CIRSTEÄ (44) und BACK (45) beim anaphylaktischen Schock des Hundes, von HABERMANN und ERDÖS beim endotoxinbehandelten Kaninchen (38). Beim hämorrhagischen Schock des Kaninchens war der Kininogenabfall weitgehend korreliert mit einem Abfall des Gesamtproteins (HABERMANN, 38). Schließlich wurde die Beteiligung des Kininsystems bei dem thermisch bedingten Pfotenödem der Ratte (ROCHA E SILVA, 46), einem der wenigen pathophysiologischen Modelle, bei denen die Rolle der Kinine bisher unwidersprochen hingenommen wurde, durch Untersuchungen von URBANITZ und Mitarbeitern (47) in Frage gestellt. Gesichert ist die Beteiligung der Kinine beim Karzinoid-Flush (50), wahrscheinlich bei Entzündungen (48,49) und eine mögliche Ursache für Schmerz und Schock bei akuter Pankreatitis (52), obwohl neuere Befunde dagegen sprechen (101). Schließlich gibt es verschiedene andere Krankheiten, die mit ungewöhnlich niedrigem Kininogenspiegel einhergehen, bei denen aber kein Schock vorliegt, z.B. die Hepatitis (101). Einige Beispiele sollten die Probleme der

Physiologie und Pathophysiologie des Kinin-Systems streifen, da die Meinungen über eine größere pathogenetische Bedeutung dieses Systems durchaus geteilt sind.

3. Natürliche Inhibitoren der Kallikreine

Ein wesentliches Regulationsprinzip im Organismus ist neben Produktion, Ausscheidung und enzymatischem Abbau die Blockierung der aktiven Zentren von Wirkstoffen durch Komplexbildung mit Inhibitoren. So kommen auch mehrere Inhibitoren vor, die *in vivo* und *in vitro* die Kininfreilegung blockieren.

Die pflanzlichen Inhibitoren aus Soja- und Limabohnen verhalten sich in Bezug auf die Kallikreinhemmung gleichartig (53), es wird nur das Plasmakallikrein gehemmt, dessen blutdrucksenkende (54,55), esterolytische (56,57) und kininliberierende (58,59) Aktivität aufgehoben werden. Im Gegensatz dazu erstreckt sich das Hemmspektrum des Inhibitors aus Kartoffeln (60) auf Kallikreine jeder Herkunft (61).

Ein weiterer Inhibitor, der alle Kallikreine hemmt, findet sich im Serum von Warm- und Kaltblütlern, bei der Reaktion handelt es sich um eine reversible Komplexbildung (62,63).

Ein sehr interessanter Hemmstoff der Kallikreine ist der Inhibitor aus Rinderorganen, der im nächsten Abschnitt ausführlicher behandelt wird.

II. Der polyvalente Proteinase-Inhibitor der Rinderorgane

1. Vorkommen

1930 fand WERLE im Arbeitskreis von KRAUT und FREY in Pankreas, Milz, Leber und Lymphknoten des Rindes einen Hemmkörper für Kallikrein (66,67), 1936 isolierten KUNITZ und NORTHROP einen Trypsininhibitor aus Rinderpankreas (68) und 1950 beschrieb ASTRUP einen Plasmininhibitor aus Rinderlunge (69). In den nächsten Jahren wurde der Zusammenhang zwischen diesen Inhibitoren von WERLE und Mitarbeitern (70, 71), WEBSTER und PIERCE (72) und MARX und WERLE (73) hergestellt. Es wurde bewiesen, daß die Hemmung von Kallikrein, Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin durch Extrakte aus Rinderorganen stets von demsel-

ben polyvalenten Inhibitor verursacht wird. Die Inhibitoren aus Rinderlunge und Rinderparotis bezeichnet man auch als Trasylol^R, dieser Name wird im klinischen Sprachgebrauch allgemein verwendet, im folgenden wird jedoch die Bezeichnung Trypsin-Kallikrein-Inhibitor vorgezogen.

2. Zur Biochemie des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors

Der Trypsin-Kallikrein-Inhibitor besitzt eine relativ hohe Säure- und Hitzestabilität. Sein Molekulargewicht beträgt 6500, Werte von 12000 - 13000 lassen sich auf eine reversible Dimerisierung zurückführen. Nach Ermittlung der Primärstruktur durch KASSEL und LASKOWSKY (74) und ANDERER und HÖRNLE (75) war die Zusammensetzung aus 58 Aminosäuren gesichert. Dabei kommen auf 10 basische (4 Lys- und 6 Arg-Reste) nur 8 saure (5 Asp- und 3 Glu-Reste) Aminosäurereste. Berücksichtigt man noch den Amidierungsgrad, so beträgt das Verhältnis basische zu saure Reste 10 : 5. Dies erklärt auch die relativ hohe Basizität des TK-Inhibitors, dessen isoelektrischer Punkt bei pH 10,5 (76) liegt.

Die Hemmung der proteolytischen, esterolytischen und kininliberierenden Aktivität von Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein kommt dadurch zustande, daß sich das Hemmzentrum des TK-Inhibitors - d.i. der Lys¹⁵-Rest bzw. die Sequenz Lys¹⁵-Ala¹⁶ (77,78) - an die aktiven Zentren dieser Enzyme anlagert. Es bildet sich ein inaktiver Enzym-Inhibitor-Komplex im Molverhältnis 1 : 1, wobei das Inhibitor-Molekül von den 4 Proteinasen - übrigens auch von Pepsin - nicht angegriffen wird. Die Dissoziationskonstanten dieser Komplexe sind im physiologischen pH-Bereich sehr klein und liegen z.B. beim Kallikrein-TK-Inhibitor-Komplex bei $10^{-8}M$ und beim Trypsin-Inhibitor-Komplex bei $10^{-12}M$ (79). Die Komplexbildung ist reversibel und pH-abhängig, bei pH 8 liegt ihr Maximum, bei pH 4 ist der Komplex praktisch vollständig dissoziiert (9).

Wird der TK-Inhibitor i.v. injiziert - nur ein kleiner Teil wird von den aktivierten Enzymen komplex gebunden - dann fällt die Konzentration des Inhibitors im Blut rasch ab (81,82), 3 min p.i. sind nur noch 20 %, 30 min p.i. noch etwa 4 % des injizierten Inhibitors im Blut zu finden. Dem folgt ein zeitlich verzö-

gerter starker Anstieg der Inhibitorkonzentration in den Nieren, so daß 60 min p.i. über 60 % der injizierten Inhibitormenge in den Nieren gefunden werden (81), in der Leber liegt die TK-Inhibitorkonzentration nie über 6 %. Nach Verteilung des Inhibitors auf Blut und Extravasalraum diffundiert der Inhibitor aus diesem in das Blut zurück, aus dem er stetig von den Nieren eliminiert wird, wobei die Halbwertszeit der Elimination aus dem Blut dann bei 70 min liegt.

3. Erläuterung pathophysiologischer Vorgänge bei Schock und Entzündung und der pharmakologischen Wirkung des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors

Die pharmakologische Wirkung des TK-Inhibitors erstreckt sich insbesondere auf 3 Funktionskreise, deren Ablauf von Proteasen induziert, gesteuert oder beeinflußt wird:

- a. Schock
- b. Entzündung
- c. Blutgerinnung und Fibrinolyse.

Die enzyminhibitorische Wirkung beschränkt sich dabei nicht auf Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein, sondern erfaßt auch Proteinasen bzw. proteolytische Vorgänge bei der Blutgerinnung, sowie bestimmte Bakterienproteasen und auch leukozytäre, lysosomale Proteinasen (83,84). Um die Angriffspunkte des TK-Inhibitors besser zu verstehen, müssen einige Kriterien pathophysiologischer Vorgänge bei Schock und Entzündung gestreift werden. Den verschiedenen Formen des Schocks sind einige Parameter gemeinsam, die sich auch im Regelkreis des hämorrhagischen Schocks wiederfinden:

Blutverlust führt zu einer Verminderung des Herzzeitvolumens und damit zu einem Blutdruckabfall. Die anschließende Katecholaminfreisetzung bewirkt eine kompensatorische reaktive Vasokonstriktion mittlerer und kleiner Gefäße, daraus resultieren periphere Mikrozirkulationsstörungen und als deren Folge eine Hypoxie im Gewebe. Die Anhäufung saurer Stoffwechselprodukte führt zu einer Acidose, diese bewirkt Gewebszerfall. Im Gewebe entwickelt sich eine Hyperosmose und eine Leukodiapedese. Sowohl Acidose als auch zerfallende Leukozyten setzen Proteasen frei bzw. aktivieren sie, dadurch wird der Abbau von Gewebsbruch-

stücken und damit die Hyperosmose verstärkt. Schließlich führen die Abbauvorgänge auch noch zur Freisetzung von vasoaktiven Polypeptiden, die eine permeabilitätssteigernde Wirkung haben. Hyperosmose und Permeabilitätssteigerung verstärken den Volumenverlust, wodurch der Kreis in sich geschlossen wird (vereinfacht nach AHNEFELD/FRANKE und REIN/SCHNEIDER). Durch die freigesetzten Katecholamine kommt es außerdem zu einer Vermehrung der freien Fettsäuren, diese führen u.U. zu direkten Thrombosierungen und aktivieren außerdem die Gerinnungsfaktoren, was eine Hyperkoagulopathie mit entsprechenden Irritationen der Endstrombahn nach sich zieht.

Zirkulations- und Stoffwechselstörungen beim entzündlichen Ödem sind qualitativ die gleichen Erscheinungen wie die Störung der Mikrozirkulation, die Hypoxie, die Acidose und ihre Folgen beim Schock. So gesehen kann man beide Prozesse, Entzündung und Schock, gemeinsam betrachten (85).

Die pharmakologischen Wirkungen des TK-Inhibitors beim Schock beruhen also auf der Hemmung verschiedener im Überschuß schädlicher Esteroproteinasen (85):

- a. Hemmung der Frühphase der Koagulation (siehe unten)
- b. Hemmung des Plasmins und damit der Hyperfibrinolyse (siehe unten), die eine überschießende Gegenregulation des Organismus beim Schock ist.
- c. Inhibition leukozytärer Proteinase.
- d. Inhibition der Kininogenasen (Kallikrein, Trypsin).

Die antiödematöse Wirkung des TK-Inhibitors (86) bei Schock und Entzündung liegt wahrscheinlich in erster Linie in der Inhibition leukozytärer Proteasen (83,85), während man über die Bedeutung der Hemmung der Kininfreisetzung geteilter Meinung ist (siehe I.2). Der ausgeprägte entzündungshemmende Effekt des TK-Inhibitors geht der antiödematösen Wirkung parallel (83,87). Über diese Wirkungen läßt sich auch der positive Einfluß des TK-Inhibitors auf andere Parameter von Schock und Entzündung erklären (85), z.B. auf den venösen Rückstrom und Sauerstoffgehalt des Blutes, den Hämatokrit, die Acidose, den Lactat Spiegel und Fettsäurestoffwechsel (88,89,90).

Der Mechanismus der Fibrinolysehemmwirkung durch den TK-Inhibitor ist am besten aufgeklärt. Durch Einwirkung eines Aktivators wird im Organismus das Plasmin aus seiner inaktiven Vorstufe, dem Plasminogen gebildet. Plasmin baut Fibrin zu Spaltprodukten ab (91,73), im Überschuß zusätzlich Fibrinogen. Der TK-Inhibitor hemmt die Fibrinolyse bzw. die Fibrinogenolyse auf zwei Wegen: Einmal wird Plasmin direkt inaktiviert, zum anderen inhibiert es den Aktivator des Plasmin (92,93).

Der TK-Inhibitor besitzt weiterhin eine relativ schwächere Gerinnungshemmwirkung in der Frühphase der Blutgerinnung, denn er ist ein schwacher Hemmstoff der Blutthrombokinasbildung (95,96) - in der Vorphase als Hemmstoff aktivierter Plasmafaktoren, besonders IX, unvollkommen V und X (94) -, ein noch schwächerer Hemmstoff der aktiven Blutthrombokinas und der Gewebsthrombokinasen (94) und unwirksam als Hemmstoff der Thrombinwirkung.

4. Therapeutische Anwendung des TK-Inhibitors

Der TK-Inhibitor wurde 1953 von Frey zur Behandlung der akuten Pankreatitis in die Klinik eingeführt und hat heute ein breites Anwendungsgebiet gefunden. So ist nach den obigen Ausführungen verständlich, daß die verschiedenen Schockformen Indikationen für eine Therapie mit dem TK-Inhibitor darstellen (85). Dies wurde in den letzten Jahren durch klinische Ergebnisse bestätigt, z.B. beim Endotoxinschock (97,98), hämorrhagischen Schock (99), Verbrennungsschock (100), beim Schock infolge Pankreatitis (101) und bei der Therapie und Prophylaxe der Fettembolie, denn entscheidend für die Entstehung der Fettembolie sind Volumenmangelschock und eine Hyperkoagulopathie (102,103). Wegen der Wirkungen auf das Blutgerinnungssystem ist Trasylol^R geeignet als partielles prophylaktisches Antiembolikum während und nach Operationen (94,104) und ganz besonders zur Blutungsnotfalltherapie bei perakuten Hyperfibrinogenolysezuständen (94), die in der Geburtshilfe und Gynäkologie eine bedeutende Rolle spielen (105,106,107). Eine Zukunft hat der TK-Inhibitor u.U. als Peritoneal-Antiadhäsivum, da er Verwachsungen durch Granulationsgewebe im Bauchraum (Ileusgefahr

usw.) verhindern kann (87,108). Neuere klinische Untersuchungen empfehlen den TK-Inhibitor in der Therapie entzündlicher und degenerativer Gelenkerkrankungen (109,83,110), doch dieses Indikationsgebiet steht wie manches andere, z.B. die Gefäß- und Kreislaufwirkung des TK-Inhibitors, erst am Anfang einer klinischen Entwicklung der Proteasen-Inhibitor-Therapie.

III. Bisherige Isolierungsverfahren von Pankreas-Kallikrein und Submandibularis-Kallikrein

In dem bisherigen Reinigungsverfahren nach WERLE und TRAUTSCHOLD (9) wird ein Pankreas-Homogenat 72 Stunden bei 37° C der Autolyse überlassen, im Verhältnis 1 : 3 mit Wasser versetzt und mit 1/5 des Gesamtvolumens an 10 %iger kolloidaler EisenoxydLösung gemischt. Aus der filtrierten Proteinlösung wird ein Acetontrockenpulver hergestellt (10 KE/mg). Dieses ist Ausgangsmaterial für zwei Verfahren:

1. Aufgelöstes Trockenpulver wird fraktioniert mit Aceton gefällt, die aktive Fraktion mit wenig Wasser gewaschen und mit M Bikarbonatlösung extrahiert. Die reinsten Präparate enthalten 1 KE/2 µg organische Substanz.

2. Das Acetontrockenpulver wird in Wasser suspendiert und 20 Stunden bei 0° C gegen 2mal 50 Liter dest. Wasser dialysiert. Das zentrifugierte Innendialysat wird auf eine Säule von DEAE-Cellulose, die mit 0,01 M Phosphatpuffer, pH 6,8, äquilibriert wurde, gegeben und mit 0,2 %iger Natriumchloridlösung gewaschen. Die Elution erfolgt mit einem NaCl-Puffer-Gradienten und gibt ein Präparat mit 1 KE/2,5 µg Protein. Die Rechromatographie nach erneuter Dialyse steigert die Reinheit bei ca. 70 % Ausbeute auf 1 KE/2 µg.

Durch die folgende Fällung mit Protaminsulfat, Dialyse und Fraktionierung an Sephadex G-25 werden Nucleinsäuren und andere Begleitstoffe abgetrennt. Erst die Elektrophorese - noch ca. 60 % der Gesamtaktivität sind vorhanden - führt unter hohen Verlusten zu Präparaten, deren reinste Fraktion 1 KE/0,8 µg Protein aufweist. Man erhält noch 12 % der Ausgangsaktivität. Entsalzen an Sephadex G-25 und Lyophilisieren schließen die Reindarstellung ab.

Bei der Reinigung von Kallikrein aus Submandibularisdrüsen vom Schwein (9) sind prinzipiell die gleichen Schritte hintereinandergeschaltet, die Ausbeute liegt bei 17 %.

In Abänderung dieser Methode wurde in einem neueren Verfahren die Säulenelektrophorese fallengelassen, die Adsorption des Kallikreins an Hydroxylapatit-Cellulose und Fraktionierung an Sephadex G-50 (bei Submandibularis-Kallikrein) durchgeführt (111,112), wodurch eine höhere Ausbeute erzielt wurde.

Besonders die ersten beschriebenen Isolierungsverfahren spiegeln Nachteile und Schwierigkeiten wider, die häufig bei der Reinigung und Anreicherung biologischer Makromoleküle auftreten. Makromoleküle, wie z.B. die Proteine, unterscheiden sich nur gering in ihren physikochemischen Eigenschaften, wie Größe, Löslichkeit und Ladung. Aber gerade diese Eigenschaften sind entscheidend bei den verschiedenen Reinigungsschritten wie Fällung mit Salzen oder organischen Lösungen, Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration, Elektrophorese usw.. Zerstörung durch hydrolyisierende Enzyme, Denaturierung infolge extremer Bedingungen u.a.m. sind die Ursachen der Verluste, die gewöhnlich bei diesen aufwendigen Isolierungsverfahren auftreten, besonders, wenn viele Schritte hintereinandergeschaltet sind.

In den letzten Jahren wurden Verfahren entwickelt, die einfachere und raschere Isolierung von Makromolekülen gestatten, die Affinitätschromatographie.

IV. Die Affinitätschromatographie

Betrachten wir Voraussetzung und Mechanismus der Affinitätschromatographie zunächst am Beispiel der Enzyme bzw. Proteine. Der erste Schritt einer enzymatischen Reaktion ist die Bindung eines Substrates an das aktive Zentrum des Enzyms. Bei der Inaktivierung wird ebenfalls an das aktive Zentrum des Enzyms das Hemmzentrum eines Inhibitors angelagert, es entsteht ein Enzym-Inhibitor-Komplex. Auf dieser Spezifität der Bindung oder der Fähigkeit dissoziierbare Komplexe zu bilden, beruht das Prinzip der Affinitätschromatographie. Angenommen, uns steht das Enzym E zur Verfügung und wir wollen den Inhibitor I dieses Enzyms aus irgendeinem Organextrakt isolieren, dann ent-

steht bei Vereinigung dieser Komponenten unter geeigneten Reaktionsbedingungen der spezifische Komplex EI. Aber Enzym, Inhibitor und Komplex sind als globuläre Proteine wie alle anderen Substanzen des Hemogenates wasserlöslich. Wenn wir aber vorher das Enzym E durch Bindung an einen Harzträger in eine wasserunlösliche Form überführen, dann den Komplex EI bilden und anschließend die störenden Begleitsubstanzen des Reaktionsgemisches auswaschen, bleibt uns der Komplex EI für weitere Reaktionsschritte erhalten. Dies ist somit prinzipiell das Verfahren der Affinitätschromatographie:

Das wasserlösliche Enzym wird kovalent an einen wasserunlöslichen Träger gebunden und damit eine Säule gepackt. Passiert dann eine Mischung die Säule, werden nur die Moleküle in der Säule gebunden, die zu dem Enzym eine hohe Affinität besitzen, also die Inhibitormoleküle. Nach Entfernen aller Verunreinigungen durch gründliches Waschen werden Bedingungen geschaffen, unter denen der Komplex instabil wird und der gereinigte Inhibitor eluiert werden kann (113). Es wäre naheliegend, daß ebenso der Inhibitor in eine wasserunlösliche Form gebracht und somit das entsprechende Enzym isoliert werden kann. Ganz allgemein kann jedes geeignete kleine organische Molekül oder Makromolekül an einen wasserunlöslichen Träger gebunden - im angelsächsischen Schrifttum ist dies die Bildung des unlöslichen, kovalent gebundenen Liganden - und damit die Moleküle isoliert werden, die eine hohe Affinität zu diesen Liganden haben. Diese Technik wurde erfolgreich angewendet bei der Isolierung vieler biologischer Makromoleküle, wie Enzymen (114,115,116), Inhibitoren (117,118,119), Antikörpern (120,121), Antigenen (122,123), Peptiden (124) und Nucleinsäuren (125,126).

Einige wichtige Bedingungen der Affinitätschromatographie sollen kurz erwähnt werden:

a. Wasserunlöslicher Träger

Die Anzahl der negativen und positiven Ladungen, sowie die aktiven Gruppen, die den Liganden binden, sollten definiert oder bestimmbar sein. Niedrige Verschleißfähigkeit und hohe Durchflußrate, definierte Porengröße und minimale Volumenänderung bei

Wechsel von Ionenstärke und pH-Wert sind ebensowichtig. Gute Vernetzungsmöglichkeit besteht zwischen Ligand und wasserunlöslichen Trägern wie dem Polysaccharid Sepharose, dem Copolymer aus Maleinsäure und Äthylen (EMA), Carboxymethyl-Cellulose und vielen anderen Cellulose-Derivaten. Das Ausmaß der unspezifischen Adsorption von Makromolekülen durch den Träger selbst ist vernachlässigbar klein bei Sepharose, Glas und Polyacrylamid (113).

b. Bindung des Liganden an den wasserunlöslichen Träger

Voraussetzung dieser Reaktion ist das Vorhandensein einer reaktionsfähigen Gruppe im Liganden und einer reaktiven Gruppe im Harz. Der Bindung parallel geht in manchen Fällen eine chemische Modifizierung des Trägers, aus der eine noch stärkere Quervernetzung resultiert. Zu berücksichtigen ist der sterische Effekt, der die Bindung eines Makromoleküls bei der Reinigung erschwert oder verhindert, wenn als Ligand ein kleines organisches Molekül direkt an den Harzträger gebunden wird (113).

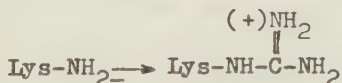
c. Adsorption und Elution

Im allgemeinen erfolgt die Bindung der Moleküle an den Liganden bei den Bedingungen, unter denen der entsprechende Komplex am stabilsten ist. Bei der Elution werden die Bedingungen so gewählt, daß der Komplex instabil wird und leicht dissoziieren kann. Dies wird z.B. erreicht durch Änderung des pH-Wertes und (oder) der Ionenstärke. Eine andere Methode basiert auf der Konkurrenz eines wasserlöslichen kompetitiven Hemmstoffes, der sich in der Elutionsflüssigkeit befindet, mit dem gebundenen Liganden um das Makromolekül.

Die Bedeutung der Affinitätschromatographie als ein zusätzliches, wesentliches Verfahren zur Reindarstellung biologischer Makromoleküle verdeutlicht allein die Tatsache, daß der Gebrauch dieser Methode in raschem Anwachsen begriffen ist.

1953 wurde von Lerman (114) die erste Enzymisolierung nach diesem Verfahren durchgeführt, zahlreiche andere folgten (siehe Übersicht bei MELROSE, 128). FRITZ und Mitarbeiter versuchten z.B.

mit wasserunlöslichen TK-Inhibitorharzen, in denen der TK-Inhibitor an ein wasserunlösliches Copolymer aus Maleinsäure und Äthylen (EMA) gebunden ist, die Proteasen Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein zu isolieren (129). Bei den Organ-kallikreinen war die erzielte Reinheit recht zufriedenstellend (Pankreas-Kallikrein hatte nach anschließender Gelfiltration denselben Reinheitsgrad wie die über Hydroxylapatit gereinigten Präparate), die Ausbeute lag aber relativ niedrig, da die Bindungskapazität dieser Inhibitorharze für Kallikrein sehr gering war, hoch genug aber bei den 3 anderen Proteasen. Versuche mit Cellulose- und Polyacrylamid-Trägern blieben erfolglos, da wahrscheinlich der native Inhibitor in der Nähe seines aktiven Zentrums an die Harze gebunden wurde. Daher wurde folgendes Experiment gemacht: Der TK-Inhibitor wurde mit aktivem Trypsin, in dem alle Lysinreste guanidiniert, d.h. in Homoargininreste umgewandelt waren, zur Komplexbildung gebracht. Nach der anschließenden Reaktion mit dem wasserunlöslichen Träger sollte das nicht gebundene guanidinierte Trypsin vom Komplex abgespalten werden, da nur eine Bindung der freien Aminogruppen des TK-Inhibitor-moleküls erwartet wurde. Erstaunlicherweise war aber auch das Trypsin gebunden, wahrscheinlich über aromatische Aminosäurereste (127). Diese Ergebnisse führten zur Herstellung eines guanidinierten TK-Inhibitor-derivates, in Stellung 15,26,41,46 wurden die Lysinreste in Homoargininreste umgewandelt:



Dieser guanidinierte TK-Inhibitor wurde tatsächlich an den Träger gebunden und besaß auch eine zufriedenstellende Bindungskapazität für Kallikreine. Damit ergab sich die Aufgabenstellung dieser Arbeit: Versuche zur Isolierung von Organ-Kallikreinen durch Affinitätschromatographie mit wasserunlöslichen Derivaten des guanidinierten Trypsin-Kallikrein-Inhibitors.

C. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Definitionen

1. Enzym-Einheit

Eine Enzym-Einheit = 1 Unit (1U) ist definiert als die Enzymmenge, die unter optimalen Bedingungen ein Mikromol (μMol) eines Substrates pro Minute umsetzt. Der 1000. Teil dieser Einheit ist eine Milli-Unit (1mU).

Zu den optimalen Bedingungen gehört ein bestimmtes Ionenmilieu (Puffer, pH), gegebenenfalls Sättigung mit dem Coenzym, in manchen Fällen die Anwesenheit von "Aktivatoren" oder "Stabilisatoren" wie z.B. Ca-Ionen und eine Substratkonzentration, die eine Linearität der Aktivitätsmessung in einem gewissen Meßbereich garantiert.

2. Biologische Kallikrein-Einheit

Eine biologische Kallikrein-Einheit (1KE) ist diejenige Menge Kallikrein, die bei i.v. Injektion am Carotidruck eines narotisierten Hundes dieselbe Senkung auslöst wie 5 ml Harn vom gesunden Menschen aus einer Sammelprobe von mindestens 50 , die 24^h gegen fließendes Wasser dialysiert worden war. Bei Pankreas-Kallikrein besteht zwischen enzymatischer und biologischer Einheit folgender Umrechnungsfaktor:

$$1 \text{ U} = 10 \text{ KE}$$

3. Kallikrein-Inhibitor-Einheit

Primär galt der TK-Inhibitor als ein Inhibitor für Kallikrein und wurde durch die Hemmung der blutdrucksenkenden Wirkung des Kallikreins in vivo quantitativ bestimmt.

Die Kallikrein-Inhibitor-Einheit (KIE) ist als diejenige Inhibitormenge definiert, die unter Standardbedingungen (15 min Inkubation bei pH 8 und 37^o C) 2 KE aus Schweinepankreas zu 50 % hemmt (130).

4. Inhibitor-Einheit

Eine enzymatische Inhibitoreinheit (1 IU) ist die Inhibitormenge, welche die durch das Enzym katalysierte Spaltung von

1 μ Mol Substrat/min unter Standardbedingungen (15 min Vorinkubation beim pH-Optimum des Enzyms und bei 25° C) total zu hemmen vermag, d.h. die gerade 1 Enzymeinheit hemmt. Der 1000. Teil dieser Einheit ist eine Inhibitor-Milli-Unit (mIU). Die Beziehung zwischen Kallikrein-Inhibitor-Einheiten (KIE) und enzymatischen Inhibitor-Milli-Einheiten (mIU) ist durch die Gleichung 1 KIE = 0,54 mIU gegeben.

II. Standardmethoden

1. Bestimmung der Kallikrein-Aktivität

a. Enzymatische Methode

Der enzymatische Test beruht auf der esterolytischen Aktivität, die der proteolytischen Kallikreinwirkung völlig parallel geht. Nach dem gleichen Prinzip wird die Aktivität von Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin bestimmt.

Kallikrein spaltet den Benzoyl-L-arginin-äthylester, der freier werdende Äthylalkohol wird quantitativ bestimmt mit Hilfe der Alkoholdehydrogenase, auf deren Coenzym Nicotinamid-Adenin-dinucleotid die freigesetzten Wasserstoffionen übertragen werden. Die durch Reduktion des Coenzym hervorgerufene Zunahme der Lichtabsorption bei 366 nm wird im Eppendorf-Photometer gemessen.

Substanzen: 1. Puffer: 15,2 g Natriumpyrophosphat, 4,1 g Semicarbazid und 0,9 g Glycin werden in 400 ml dest. Wasser gelöst, mit 2 N NaOH auf pH 8,7 eingestellt und auf 500 ml aufgefüllt.

2. Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD), (Boehringer, Mannheim), 20 mg NAD/ml aqua.dest., im Eisbad.

3. Benzoyl-L-arginin-äthylester (BAEE), (E.Merck), 3×10^{-3} M: 1,0 mg BAEE x HCl/1 ml dest. Wasser, im Eisbad.

4. Alkohol-Dehydrogenase (ADH), (Boehringer, Mannheim), 30 mg Protein/ml, im Eisbad.

Messung: In Küvetten der Schichtdicke 1 cm wird der Pyrophosphatpuffer nacheinander mit 0,1 ml NAD-, 0,5 ml BAEE- und 0,02 ml ADH-Lösung versetzt und die Mischung 5 min bei 25° C inkubiert. Danach wird die Kallikreinlösung (0,02 - 0,2 ml) zu der Inkuba-

tionslösung gegeben, deren Volumen so angesetzt wurde, daß ein Endvolumen von 3 ml resultiert. Die Meßlösung (3 ml) wird 2 min bei 25° C inkubiert und sofort danach wird ihre Extinktion bei 366 nm gegen einen Leerwert ohne Kallikrein gemessen. Die zweite Messung erfolgt nach weiteren 10 min. Eine Extinktionsänderung von $E = 0,110$ entspricht der Freisetzung von 10 nMol Äthanol/min oder 10 mU (9,131).

b. Biologische Methode

In Homogenaten und Körperflüssigkeiten sowie in Gegenwart größerer Mengen von Fremdeiweiß verhindern Störungen z.T. noch unbekannter Ursache die exakte Bestimmung der Kallikreinaktivität mit dem enzymatischen Test. Hier liefert nur die biologische Bestimmungsmethode (Hundeblutdruck) reproduzierbare Ergebnisse (132):

Einem künstlich beatmeten, unter Pernocton^R- oder Barbital^R-Narkose stehenden Hund von 5-10 kg Gewicht wird die Testsubstanz in die v. saphena injiziert. Ein Ludwigsches Quecksilbermanometer zeigt über die a.carotis den Blutdruckabfall nach Injektion an. Der Kunststoffschlauch, mit dem diese Verbindung hergestellt wird, ist mit 2-3 Ampullen Vetren^R (je 200 I.E. Heparin) gefüllt, um eine Blutgerinnung auszuschalten. Die untere Grenze der Ansprechbarkeit liegt bei 0,005-0,02 KE/kg Tier. Man injiziert jeweils zwischen 0,05 und 0,15 KE. An jede Injektion von Kallikrein schließen sich 1-2 ml physiologische Kochsalzlösung an. Zwischen den einzelnen Proben ist eine Pause von 10 min erforderlich. Mit der Blutdruckwirkung eines Standardpräparates (z.B. Padutin^R) kann der durch die Testsubstanz verursachte Blutdruckabfall verglichen werden. Gleiche Blutdrucksenkung beider Präparate läßt eine Aussage über den Umrechnungsfaktor ($1 \text{ U} = x \text{ KE}$) für die Testkallikreine zu, wenn für Pankreas-Kallikrein die Gleichung $1 \text{ U} = 10 \text{ KE}$ aufgestellt wird.

2. Bestimmung der Trypsin bzw. Plasmin-Aktivität

Das Substrat für Trypsin und Plasmin im enzymatischen Test ist Benzoyl-DL-arginin-p-nitro-anilid. Das bei der Spaltung gebildete p-Nitroanilin wird quantitativ bestimmt durch Messung

der Extinktionsänderung bei 405 nm.

Substanzen: 1. Puffer: Triäthanolamin-hydrochlorid (TRA), 0,2 M.
18,6 g TRA werden in 400 ml dest. Wasser gelöst
(bei Plasmintest mit L-Lysin-monohydrochlorid),
mit 2 N NaOH auf pH 7,8 eingestellt und auf 500
ml aufgefüllt.

2. Benzoyl-DL-arginin-p-nitro-anilid (BAPNA), 100
mg/100 ml dest. Wasser, bei 100° C gelöst.

Messung: In Küvetten der Schichtdicke 1cm wird der TRA-Puffer
mit der Trypsin- oder Plasminlösung und anschließend mit 1ml
BAPNA versetzt, so daß ein Endvolumen von 3 ml resultiert. Die
Mischung wird 1 min bei 25° C inkubiert und dann ihre Extinktion
bei 405 nm gemessen (Leerwert nicht erforderlich). Im Abstand
von 1 min folgen 10 weitere Messungen, aus denen der Mittelwert
der Extinktionsänderung/min bestimmt wird. Ein ΔE von 0,00332/
min/3 ml entspricht der Freisetzung von 1 nMol p-Nitroanilin/
min oder 1 mU.

3. Bestimmung der Chymotrypsinaktivität

Da Chymotrypsin die Phenylalanyl-Bindung spaltet, nicht die
Arginyl-Bindung wie Trypsin und Plasmin, ist das Substrat im en-
zymatischen Test Succinyl-phenylalanin-p-nitro-anilid. Bei der
Spaltung entsteht ebenfalls p-Nitroanilin, dessen Bildung bei
405 nm durch eine Extinktionszunahme angezeigt wird.

Substanzen: 1. 0,2 M Triäthanolamin-hydrochlorid-Puffer (TRA),
siehe II.2, zusätzlich 0,02 M CaCl_2 .

2. Succinyl-phenylalanin-p-nitro-anilid (Suphepa,
Merck), 5 mg/ml TRA (mit 0,02 M CaCl_2), bei
100° C im Wasserbad gelöst.

Messung: Substanzmengen s. unter II.2. Die Messung erfolgt über
30 min (1 Messung/3 min), da die Extinktionsänderung relativ
klein ist in dem Bereich, in dem ΔE proportional zur eingesetz-
ten Chymotrypsinmenge zunimmt (Extinktionswerte von 0,07 bis
0,120/3 ml/3 min für den Test verwertbar, Testhilfe: 20 µg Chy-
motrypsin-Novo bewirken ein ΔE von ca. 0,080/3 ml/30 min). Ein
 ΔE von 0,00332/min/3 ml entspricht der Freisetzung von 1 nMol
p-Nitroanilin/min oder 1 mU.

4. Bestimmung der Aktivität des TK-Inhibitors bzw. des guanidi- nierten TK-Inhibitors

a. Quantitativer Nachweis der Hemmung von Kallikrein

Substanzen: siehe II.1.a, zusätzlich: 0,2 M TRA, pH 7,8 (18,6 g TRA werden in 400 ml dest. Wasser gelöst, mit 2N NaOH auf pH 7,8 eingestellt und auf 50 ml aufgefüllt).

Messung: In ein Reagenzglas werden nacheinander 0,1 ml Kallikreinlösung (etwa 100 mU), 0,1-0,9 ml Inhibitorlösung und 0,2 M TRA-Puffer pipettiert, so daß ein Endvolumen von 1 ml resultiert. Die Mischung wird 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann 0,05-0,1 ml zu dem unter II.1.a geschilderten Ansatz zur enzymatischen Bestimmung der Kallikreinaktivität gegeben und gegen einen Leerwert ohne Inhibitor gemessen. Eine Inhibitor-Milli-Unit (1 mIU) führt zu einer Reduktion der Extinktionsänderung bei 366 nm um ΔE 0,011/min, das entspricht der Hemmung von 1 mU Kallikrein.

b. Quantitativer Nachweis der Hemmung von Trypsin

Dieses Standardverfahren ist einfacher als das oben beschriebene.

Substanzen: siehe II.2, zusätzlich Trypsin-Standard (Novo), 5 mg Trypsin/100 ml 0,0025 N HCl, davon für den Test eine Probe entnehmen (Eisbad).

Messung: s. auch II.2.

In Küvetten der Schichtdicke 1 cm wird der TRA-Puffer mit 0,2 ml des Trypsin-Standards, der Inhibitorlösung und 1 ml BAPNA versetzt (Endvolumen 3 ml), diese Mischung 1-5 min bei 25° C inkubiert und dann ihre Extinktion bei 405 nm gegen einen Leerwert gemessen. Eine Inhibitor-Milli-Unit (1 mIU) führt zu einer Reduktion der Extinktionsänderung um ΔE 0,00332/min/3 ml.

5. Sephadex-Gelfiltration

Bei diesem Chromatographieverfahren trennt man Substanzen nach ihrer Molekülgröße. Die Dextran-Gele (Sephadex, Fa. Pharmacia) haben in ihrem dreidimensionalen Netzwerk wassergefüllt Hohlräume, in denen Ionen und niedermolekulare Stoffe Platz haben, größere Proteine aber nicht. Die kleinen Moleküle verfangen sich in

den Maschen, die hochmolekularen Substanzen erscheinen zuerst im Eluat. So kann man Proteine bequem entsalzen und in diesen Molekularsieben auch nach Molekülgröße trennen. Die verschiedenen Geltypen haben definierte Perlgrößen (G-25, G-50, G-75, G-100, fine und superfine).

6. Automatische Aminosäureanalyse

a. Hydrolyse

Die Aminosäureanalyse dient zur Ermittlung der Bruttozusammensetzung von Peptiden und Proteinen. Sie setzt eine hydrolytische Aufspaltung des Ausgangsmaterials in die einzelnen Aminosäuren voraus. Die gebräuchlichste Hydrolysenmethode ist die Säurespaltung mit 6 N HCl bei 110° C über 20 Stunden. Bei diesem Verfahren wird Tryptophan völlig zerstört, Threonin und Serin teilweise bei längeren Hydrolysezeiten. Fast alle Peptidbindungen sind bereits nach 8 Stunden gespalten, nur einige Kombinationen zwischen den Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin benötigen aufgrund ihrer sterischen Anordnung eine Hydrolysezeit bis zu 400 Stunden.

b. Chromatographie

Die Auftrennung des bei der Hydrolyse entstandenen Aminosäuregemisches geschieht mit Hilfe der Säulenchromatographie an einem Ionenaustauscher⁺). Bei den gebräuchlichen Verfahren, die alle aus der Aminosäureanalyse von Stein und Moore entwickelt wurden, verwendet man einen Kationenaustauscher mit Sulfonatgruppen ($-\text{SO}_3^-$) an einer Polystyrolmatrix. Die zwitterionischen Aminosäuren werden zunächst bei pH 2,2 (also nahezu ausschließlich in kationischer Form) auf die Säule aufgetragen und fest an die negativen

⁺) Ionenaustauscher sind unlösliche aber doch dissoziierbare Stoffe, die dadurch entstehen, daß geladene Gruppen (Austauschergruppen) an eine unlösliche Matrix gebunden sind. Die Gegenionen, die zum Ladungsausgleich erforderlich sind, können gegen andere, gleichgeladene ausgetauscht werden. Je nachdem, ob sie positive oder negative Austauschergruppen haben, spricht man von Anionen- oder Kationenaustauschern. Sind die Gegenionen die Ionen des Wassers, so bekommen die Ionenaustauscher den Charakter von Säuren oder Basen. Sie werden deshalb oft auch in saure oder basische Austauscher unterschieden.

Ladungen des Ionenaustauschers gebunden. Dabei werden Natriumionen, die ursprünglichen Gegenionen der Sulfonatgruppen, verdrängt. Danach kann die Auftrennung begonnen werden. Bei Elution mit einem Puffer von pH 3,25 treten nun wieder negative Ladungen an den Carboxylgruppen der Aminosäuren auf und die Bindung an den Austauscher wird wegen der Abstoßungskräfte (zwischen Sulfonatgruppen und Carboxylgruppen) schwächer. Je nach Stärke der Bindung der Aminogruppen (abhängig von ihrem jeweiligen pK-Wert) und Stärke der Abstoßung der Carboxylgruppen (abhängig von deren jeweiligen pK-Wert) beginnen die Aminosäuren entlang der Säule zu wandern, wobei sie in statistischer Folge unzählige Male wieder gebunden und wieder abgestoßen werden. Kleine Unterschiede in den pK-Werten der einzelnen Aminosäuren führen dazu, daß ihre mittleren Wanderungsgeschwindigkeiten verschieden sind und sie deswegen nacheinander aus der Säule ausfließen. Damit die Sulfonatgruppen des Austauschers nach Ablösung einer Aminosäure nicht als unkompenzierte Ladungen zurückbleiben (oder H^+ aus dem Puffer binden müssen, was pH-Verschiebungen zur Folge hätte) enthält der Puffer auch Natriumionen.

Die Unterschiede in den Wanderungsgeschwindigkeiten der Aminosäuren sind zum Teil recht erheblich. Das liegt daran, daß es außer den "neutralen" Aminosäuren mit je einer Aminogruppe und Carboxylgruppe auch die "sauren" mit zwei Carboxylgruppen und die "basischen" mit zwei Aminogruppen gibt. Bei pH 3,25 werden die sauren Aminosäuren gut eluiert, dann wird der Puffer gegen einen von pH 4,25 ausgetauscht und die Elution der neutralen Aminosäuren wird damit im rechten Maße beschleunigt. Die basischen Aminosäuren werden zweckmäßigerweise in einem gesonderten Lauf auf wesentlich kleineren Säulen bei pH 5,28 aufgetrennt. Dabei erscheinen die sauren und die neutralen Aminosäuren gemeinsam und können also nicht bestimmt werden.

c. Farbreaktion

Das aus der Säule ausfließende Eluat wird mit Ninhydrinreagenz versetzt und fließt dann durch eine Reaktionsspule aus Teflonschlauch, die auf $100^{\circ}C$ geheizt ist. Die Länge des Spulenschlauches ist dabei so bemessen, daß eine Reaktionszeit von 10 Minuten erreicht wird. Dabei bildet sich im Eluat ein blauer

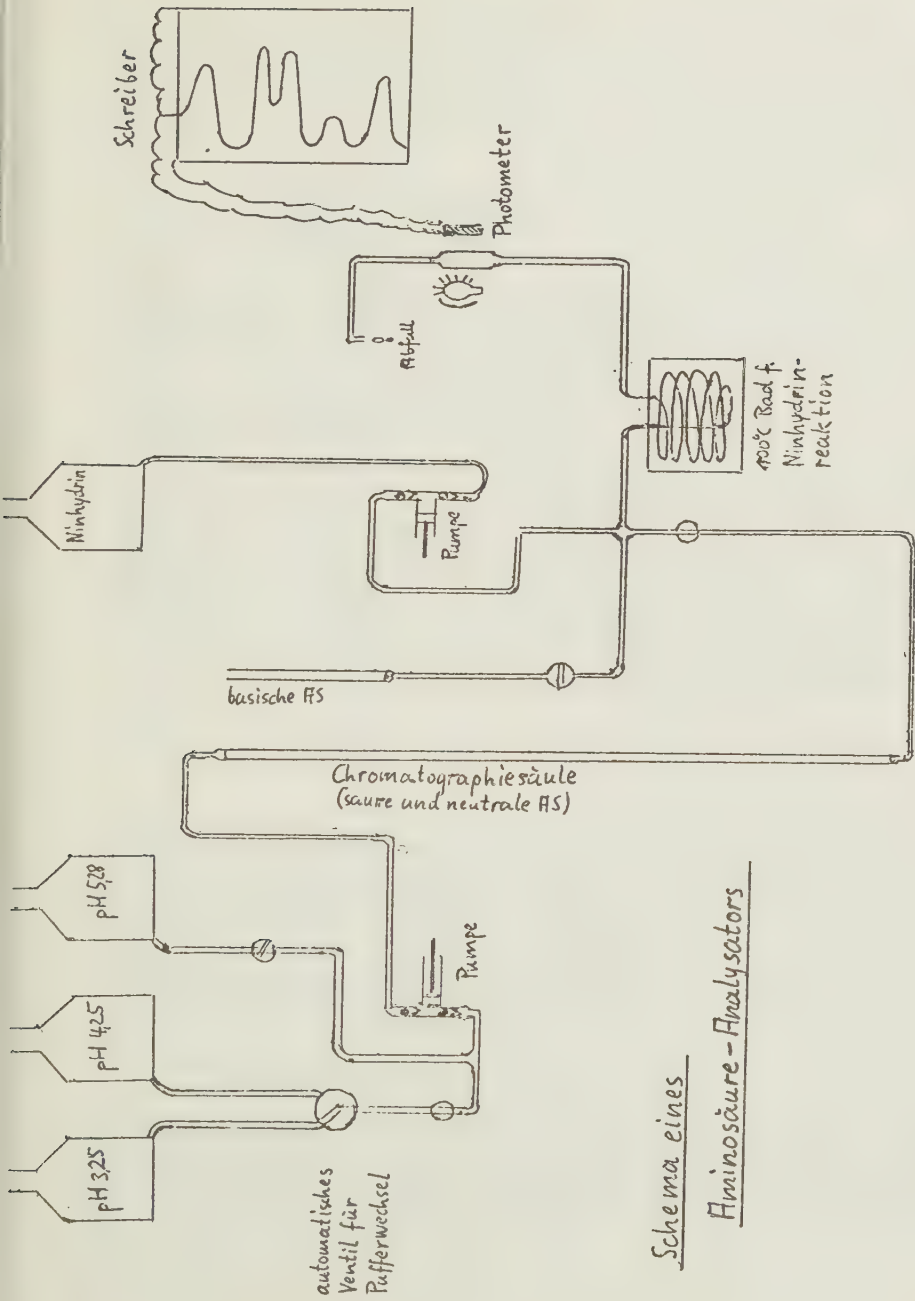
Farbstoff und die gefärbte Lösung passiert nun eine Durchflußküvette, in der die Farbintensität von einem Schreiber registriert wird. Jede Aminosäure bildet dabei auf dem Registrierpapier einen Gipfel. Die Lage des Gipfels gibt an, um welche Aminosäure es sich handelt, die Fläche unter dem Gipfel ist der Menge der einzelnen Aminosäuren proportional.

d. Quantitative Auswertung der Kurven

Die Flächen unter den Gipfeln werden nach einem guten Näherungsverfahren bestimmt (es handelt sich um fast ideale Gaußkurven). Sie sind der Aminosäuremenge proportional und werden deswegen mit Proportionalitätsfaktoren multipliziert. Danach erhält man die Menge der einzelnen Aminosäuren direkt in μMol . Die Proportionalitätsfaktoren, von denen für jede Aminosäure ein eigener verwendet werden muß, sind sehr komplexe Größen. Der einfachste Weg diese Faktoren zu erhalten ist gleichzeitig der genaueste. Es werden Testläufe mit bekannten synthetischen Aminosäuregemischen gemacht (z.B. je Aminosäure $1/2 \mu\text{Mol}$) und die zu $1 \mu\text{Mol}$ Aminosäure zugehörigen Flächen berechnet. Dividiert man die Fläche unter dem Gipfel einer unbekannten Menge Aminosäure durch solche Größe, so erhält man direkt die μMol -Menge. Die Reziproken der aus Testläufen ermittelten Flächen für $1 \mu\text{Mol}$ sind also direkt die gesuchten Faktoren. Sie enthalten alle notwendigen Naturkonstanten, Apparatkonstanten (individuell für jedes Gerät) und Korrekturfaktoren.

Damit ist es möglich, die Bruttoformel der Peptide oder Proteine zu berechnen. Die Bruttoformel gibt an, in welchen ganzzahligen Verhältnissen zueinander die Aminosäuren in einer Analysenprobe und damit in dem untersuchten Protein vor-

handen sind. Wegen eines unvermeidlichen Analysenfehlers von 1 - 2 % pro Aminosäure geht diese Rechnung nicht vollständig auf. Wenn erforderlich, können die erhaltenen Werte infolge der geringen Abweichungen auf- oder abgerundet werden (siehe auch Abbildung nächste Seite, 133).



Schema eines
Aminosäure-Analysators

III. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

1. Herstellung und Charakterisierung von guanidinierten TK-Inhibitor und wasserunlöslichen Inhibitorharzen

a. Guanidinierung des TK-Inhibitors

Ansatz: 1920 mg TK-Inhibitor (Trasylol^R der Fa. Bayer, Labor Dr. Göller, Angabe: 6500 KIE/mg, das entspricht 3500 mIU/mg im Trypsintest) wurden in 400 ml dest. Wasser (0,02 M EDTA, auf pH 9,5 mit verd. Ammoniak eingestellt) gegeben. Die Inhibitorlösung wurde anschließend unter Rühren im Eisbad bei konstantem pH von 9,5 (mit 10 N NaOH nachgestellt) langsam mit 72 g O-Methylisoharnstoff versetzt, danach noch ca. eine Stunde kräftig gerührt und dann kühl aufbewahrt. Nach 72 Stunden wurden unter denselben Bedingungen weitere 72 g O-Methylisoharnstoff in die Salzlösung eingerührt, wobei ein Niederschlag auskristallisierte (Salzüberschuß). Nach 4 Tagen wurde die Inhibitor-Salzlösung 6 Stdn. gegen 50 l dest. Wasser dialysiert, danach mittels Ultrafiltration (Gerät Diaflo der Fa. Amicon, Filter UM 05) eingeengt und entsalzt und abschließend lyophilisiert (gefriergetrocknet).

b. Entsalzung und Fraktionierung des guanidinierten TK-Inhibitors an Sephadex G-25

Der lyophilisierte guanidinierte TK-Inhibitor (Gesamtaktivität: 2760 IU, spez. Aktivität: 1640 mIU/mg, BAPNA-Test) war noch salzhaltig und wurde daher auf eine Sephadex G-25-Säule (3 x 92 cm) gegeben und mit 5 % Essigsäure entwickelt. Der an die Säule angeschlossene Extinktionsschreiber (Uvicord) zeigte 3 Peaks (Schulterbildung) an, die Fraktionen von Peak I und Peak II wurden getrennt vereinigt (Peak III hatte nur 20 IU Aktivität) und lyophilisiert.

Peak I ergab 451 mg lockeres, weißes Pulver (spezif. Aktivität: 3160 mIU/mg, Gesamtaktivität: 1420 IU, BAPNA-Test), Peak II 258 mg (spezif. Aktivität: 2740 mIU/mg, Gesamtaktivität: 710 IU).

c. Aminosäureanalyse des guanidinierten TK-Inhibitors

Nach dem unter C.II.6 beschriebenen Verfahren wurde von dem guanidinierten TK-Inhibitor, Peak II, eine Aminosäureanalyse gemacht (s. Tab. 1).

Aminosäure	Verhältnisse der AS im guanid.TK-Inhibitor	
Asp	5.04	Tab.1: Ergebnisse der 20 Std. Hydrolyse von 200 µg guanidinierten TK-Inhibitors (Peak II) in 6 N HCl, 110° C.
Thr	3.01	
Ser	1.08	
Glu	3.24	
Pro	(4.46)	
Gly	5.88	Damit ergibt sich, daß die Guanidinierung praktisch vollständig verlaufen ist, der Lysinwert beträgt nur noch 0,13, während wir im TK-Inhibitor 4 Lys-Reste haben.
Ala	5.88	
Cys 1/2	5.83	Der Homoarg.-Wert erscheint bei der Analyse sehr verzögert und wurde nicht abgewartet.
Val	0.81	
Met	n.a.	Der Pro-Wert wurde vom Integrator nicht ausgewertet, deshalb sind nur ungefähre, handkorr. Werte angegeben. Arg, Val, Ile sind erst nach mindestens 120 Stunden Hydrolyse voll freigesetzt.
Ile	0.82	
Leu	2.10	
Tyr	3.79	
Phe	4.11	
Lys	<u>0.13</u>	
His	0.00	
Arg	5.74	
Homo-Arg	n.a.	

d. Herstellung wasserunlöslicher Derivate des Homoarginin-TK-Inhibitors

aa. Polyamphoteres Inhibitorharz (N-Harz)

Ansatz: 32 ml 0,5 N HCl wurden mit 640 mg Carboxymethylcellulosehydrazid (Merck) versetzt, kurz homogenisiert (ca. 30 sek) und anschließend unter Rühren 1,6 ml 10 % Natriumnitritlösung (NaNO_2) zugegeben (Stärkepapier zeigte Ende der Umwandlung in das Azid an). Der ausgeflockte Niederschlag wurde nach einer Ruhezeit von 15 min in der Kälte (alle Substanzen waren auf 0° - 2° C

vorgekühlt) abzentrifugiert, in 16 ml Eiswasser aufgerührt und wiederum zentrifugiert. Nach Homogenisieren des abgesetzten Harz-Azid in 25 ml 0,1 M Boratpuffer und Zugabe von etwas verd. NaOH bis zur alkalischen Reaktion wurde die Suspension mit 129 mg guanidinierten TK-Inhibitor (Peak II, 355 IU/129 mg/10 ml Boratpuffer) bei pH 8,5 umgesetzt. Nach einer Rührzeit von 4 min erfolgte die Zugabe von 15 ml 0,5 M NH_4Cl -Lösung, bei pH 8 (verd. Ammoniak) wurde das Gemisch weitere 15 min in der Kälte gerührt und dann zentrifugiert. Das Inhibitorharz wurde dann 6mal mit Salzpufferlösung (2mal mit 1 N NaCl plus etwas TRA, 2mal mit 1 N NaCl, 2mal mit 0,1 M TRA plus 0,3 M NaCl, pH 7,9), danach 5mal mit gekühlten dest. Wasser gewaschen und abschließend lyophilisiert. Die Gefriertrocknung ergab 100 mg Inhibitorharz.

Die gesammelten Überstände enthielten eine Aktivität von 97 IU (BAPNA), s. Tab. 3.

bb. Polyanionisches Inhibitorharz (A-Harz)

Bei analogem Ansatz wie oben wurden 231 mg Inhibitorharz erhalten. Die Zugabe des NH_4Cl erfolgte hier 26 min später als bei Ansatz aa.

Die Aktivität der vereinigten Überstände betrug 37,4 IU.

e. Aminosäureanalyse des N- und A-Harzes

Die Einwaage der Analysenproben betrug bei N- und A-Harz je 670 μg . Die Ergebnisse der Aminosäureanalyse s. Tab. 2 und 3.

Auswertung der Analyse: Die Zahl der Aminosäurereste entsprechen sich bei N- und A-Harz weitgehend (s. auch niedrige Lys-Werte und vgl. mit Tab. 1). Aus den Analysenwerten wurde berechnet, daß das N-Harz ca. 39 Gew. % an guanidinierten TK-Inhibitor enthält, das A-Harz ca. 36 Gew. %, (siehe Tab. 2 u. 3). Dieses Ergebnis war im Falle des N-Harzes überraschend, denn die Inhibitoraktivität der gesammelten Überstände betrug ja nur 97 IU beim N-Harz und 37,4 IU beim A-Harz (BAPNA-Test). Dies hätte die Bindung von 73 % (N-Harz) bzw. 89,5 % (A-Harz) des eingesetzten Inhibitors bedeutet, während die Harz-Analyse 42 % (N-Harz) bzw. 89 % (A-Harz) ergab (s. Tab. 3). Bei der Herstellung des N-Harzes muß also ein bedeutender Teil des guanidinierten TK-Inhibitors

in inaktiver Form in Lösung gegangen sein.

Aminosäure	N-Harz	A-Harz
Asp	5.04	5.18
Thr	2.91	3.03
Ser	1.02	1.02
Glu	3.24	3.21
Pro	4.04	4.03
Gly	5.95	6.06
Ala	5.77	5.99
Cys 1/2	5.89	6.03
Val	0.97	0.97
Met	n.a.	n.a.
Ile	1.21	n.a.
Leu	2.10	n.a.
Tyr	3.84	3.93
Phe	4.17	4.26
Lys	<u>0.20</u>	<u>0.14</u>
His	0.00	0.00
Arg	n.a.	n.a.

Tab. 2: Ergebnisse der 40 Stdn. Hydrolyse des N- und A-Inhibitorharzes (je 670 μ g) in 6 N HCl, 110° C.

	N-Harz	A-Harz
Inhibitor-Units im Ansatz (IU)	355	355
gebundener Inhibitor (mg) ^a	39	83
gebundener Inhibitor (IU)	147	316
gebundener Inhibitor (%) ^b	42	89

Tab. 3: Unterschiede des N- und A-Harzes in Bezug auf Gewicht und gebundene Inhibitormenge (Herstellung der Harze siehe unter III.1.d).

a: berechnet aus den Analysen der Tab. 2

b: bezogen auf den eingesetzten Inhibitor (355 IU)

f. Bindungs- und Dissoziationsversuch mit Trypsin

aa. N-Harz

Bindung: 20 mg Trypsin (Novo) wurden in 2 ml Salz-Pufferlösung (0,5 M NaCl, 0,05 M TRA, pH 7,8) gegeben und diese Enzymlösung mit 10 mg N-Harz (14,7 IU im Trypsintest) versetzt. Danach wurde die Suspension 10 min geschüttelt, zentrifugiert und nach Abpipettieren des Überstandes der Niederschlag 2mal mit je 2 ml dest. Wasser gewaschen, wiederum zentrifugiert und anschließend die Enzymkonzentration in den gesammelten überstehenden Lösungen bestimmt.

Dissoziation: Der unlösliche Enzym-Inhibitorharz-Komplex wurde in 2 ml 0,5 M KCl-Lösung aufgerührt, mit einer Mikroelektrode der betreffende pH-Wert der Suspension durch Zugabe von 0,1 ml verd. HCl/KCl-Lösung eingestellt, 10 min geschüttelt, abzentrifugiert, 0,1 ml der überstehenden Lösung abpipettiert und deren Enzymkonzentration bestimmt. Dies wurde, jeweils bei Raumtemperatur, bei verschiedenen pH-Werten (absteigend von pH 4,6 bis 2,15) wiederholt (s. Abb. 1, Tab. 4).

bb. A-Harz

Die analoge Versuchsdurchführung wie unter aa. beschrieben erfolgte mit 10 mg A-Harz (13,6 IU), (s. Abb. 1, Tab. 4).

Tab. 4: Bindung von Trypsin an N- bzw. A-Inhibitorharz und Dissoziation des Enzyms bei verschiedenen pH-Werten. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Inhibitor-	Bezeichnung	N-Harz (10 mg)		A-Harz (10 mg)	
harz	geb.inhibitor (IU) ^a	14,7		13,6	
Trypsin	zugegeben (U)	20		20	
	gebunden (U)	14,2		13,5	
		pH		pH	
		(4,6)	7,8	(4,7)	10,7
	abgelöstes Trypsin (%) ^b	(3,65)	21,8	(3,8)	19
		(3,15)	42,5	(3,15)	34,4
		(2,65)	42,5	(2,65)	32,6
		(2,15)	42,5	(2,1)	31,5

^a: IU im Trypsintest bestimmt

^b: in % des gebundenen

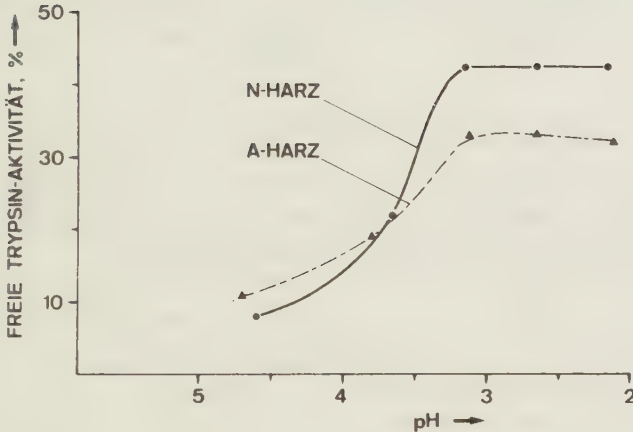


Abb. 1: Dissoziationsverhalten von Trypsin-TK-Inhibitorharz-Komplexen bei verschiedenen pH-Werten (graphische Darstellung der Tab. 4). Die Ablösung des Trypsins erfolgte im Batschverfahren mit 0,5 M KCl/HCl-Puffer, siehe III.1.f.aa.

Abszisse: pH-Wert des Dissoziationspuffers

Ordinate: Aktivität des dissoziierten Trypsins
in % des gebundenen

N-Harz: —●—●—

A-Harz: - - -▲- - -▲- - -

Substrat im enzym. Test: BAPNA

g. Bindungs- und Dissoziationsversuch mit Chymotrypsin

aa. N-Harz

Mit 10 mg N-Harz (14,7 IU im Trypsintest) und 20 mg Chymotrypsin (Novo, Ca-stabilisiert) wurde der gleiche Versuch durchgeführt wie bei f.aa, der TRA-Puffer enthielt noch 0,02 M CaCl_2 .

Zusätzlich wurde das Dissoziationsverhalten bei neutralem bzw. schwach basischem pH untersucht, in diesem pH-Bereich wurde gleichfalls der NaCl/TRA-Puffer verwendet (s. Tab. 5, Abb. 2).

bb. A-Harz

Versuchsdurchführung analog N-Harz (s. Tab. 5, Abb. 2).

Tab. 5: Bindung von Chymotrypsin an N- bzw. A-Inhibitorharz, Dissoziation des Enzyms bei verschiedenen pH-Werten (Versuchsdurchführung s. f.aa und g.aa).

Bezeichnung		N-Harz (10 mg)	A-Harz (10 mg)
Inhibitorharz			
geb.Inhibitor (IU) ^a		14,7	13,6
zugegeben (mU)		1000	1000
Chymotrypsin			
gebunden (mU)		354	339
		pH	pH
		(7,8) 14	(7,7) 15,6
abgelöstes		(6,55) 19,8	(6,5) 16,5
Chymotrypsin (%) ^b		(5,1) 31,6	(5,1) 23,6
		(4,15) 53	(4,1) 25,8
		(3,1) 51,5	(3,15) 21

a: Aktivität des gebundenen Inhibitors (IU) im Trypsintest bestimmt

b: Das abgelöste Chymotrypsin ist in % des gebundenen angegeben

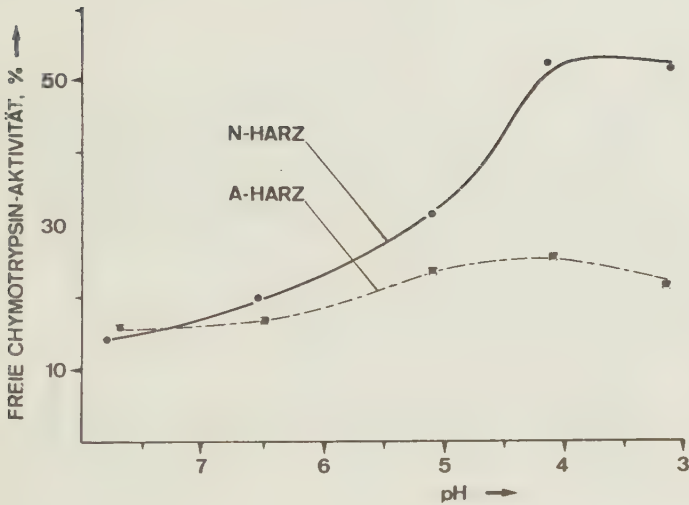


Abb. 2: Dissoziationsverhalten von Chymotrypsin-TK-Inhibitor-Komplexen bei verschiedenen pH-Werten (graphische Darstellung der Tab. 5). Die Ablösung des Chymotrypsins erfolgte im Batchverfahren (siehe III.1. f.aa und g.aa).

Abszisse: pH-Wert des Dissoziationspuffers

Ordinate: Aktivität des dissoziierten Chymotrypsins
in % des gebundenen

N-Harz: —●—●—

A-Harz: - - -■- - -■- - -

Substrat im enzym Test: Suphepa (plus 0,02 M CaCl_2)

h. Bindungs- und Dissoziationsversuch mit Kallikrein

aa. N-Harz

Erster Bindungsschritt: 20 mg Pankreas-Kallikrein (Bayer SK/K 187) wurden in 2 ml Salz-Pufferlösung (0,3 M NaCl, 0,1 M TRA, pH 7,8) gegeben und nach Zugabe von 10 mg N-Harz wurde die Suspension so behandelt wie bei f.aa.

Erster Dissoziationsversuch: Nach Aufrühren des unlöslichen Kallikrein-TK-Inhibitorharz-Komplexes in 2 ml 0,7 M Salzlösung (0,5 M Guanidin-HCl, 0,2 M NaAc, 0,001 M EDTA) erfolgte bei pH-Werten von 7,8 bis 5,7 keine Dissoziation. Daher erfolgte

Zweiter Bindungsversuch: Der Enzym-Inhibitorharz-Komplex wurde mit 15 mg Pankreas-Kallikrein umgesetzt, Versuchsablauf siehe oben und f.aa. Der

2. Dissoziationsversuch fand bei pH 6 statt, verwendet wurde wieder die 0,7 M Guanidin-HCl-Pufferlösung, s. Tab. 6.

bb. A-Harz

Der Versuch mit 10 mg A-Harz erfolgte mit den gleichen Mengen Pankreas-Kallikrein und ebenfalls in zwei Schritten analog h.aa (s. Tab. 6).

Tab. 6: Bindung von Pankreas-Kallikrein an N- bzw. A-Inhibitorharz im ersten (1a) bzw. zweiten (2a) Bindungsschritt. Dissoziation des Enzyms nach dem ersten Bindungsschritt bei den angegebenen pH-Werten (1b), nach dem zweiten Bindungsschritt bei pH 6 (2b).

Inhibitor- harz	Bezeichnung		N-Harz (10 mg) A-Harz (10 mg)	
	geb.Inhibitor (IU)		14,7	13,6
Pankreas-	zugegeben	(U)	1a 288	288
			2a 216	216
Kallikrein	gebunden	(U)	1a 262	180
			2a 167,5	123
			1b	pH (7,8.6,3.5,7)
	abgelöstes		---	---
	Kallikrein	(U)	2b	pH (6)
			33	29,5

i. Ergebnisse aus den Versuchen 1.d - h

aa: Das polyamphotere oder N-Harz, bei dessen Herstellung basische Gruppen in die polyanionische Harzmatrix eingebaut wurden, bindet einen geringeren Anteil an guanidinierten TK-Inhibitor als das polyanionische oder A-Harz. Die Aminosäureanalyse ergab, daß das N-Harz 42 %, das A-Harz 89 % des eingesetzten Inhibitors gebunden hatte (s. Tab. 2 u. 3).

bb: Aus Tab. 4, 5 und 6 ist das spezifische Bindungsvermögen und damit die Bindungskapazität der Inhibitorharze gegenüber Trypsin, Chymotrypsin und Pankreas-Kallikrein zu ersehen. Dabei ist die Bindungskapazität von N- und A-Harz gegenüber Trypsin nahezu gleich groß, ebenso gegenüber Chymotrypsin. Unterschiedlich ist dagegen das Bindungsvermögen der Harze gegenüber Pankreas-Kallikrein, das N-Harz bindet 25 % mehr Kallikrein als die vergleichbare Menge A-Harz (s. Tab. 4, 5 u. 6). Auffallend ist das unterschiedliche Bindungsvermögen der Harze gegenüber Trypsin und Kallikrein. Im N- und A-Harz sind praktisch 100 % des gebundenen guanidinierten TK-Inhibitors aktiv gegenüber Trypsin (s. Tab. 4), während im N-Harz 10 %, im A-Harz 7,3 % des Inhibitors Kallikrein gebunden haben.

cc. Unterschiedlich ist auch das Dissoziationsverhalten der Enzym-Inhibitorharz-Komplexe. Der Dissoziationsgrad steigt mit zunehmender H^+ -Konzentration: bei pH 4,6 sind 7,8 % (N-Harz) bzw. 10,7 % (A-Harz) des Trypsins dissoziiert, bei pH 3,15 42,5 % (N-Harz) bzw. 34,4 % (A-Harz). Das Trypsin ist bei pH 3,15 maximal dissoziiert, beim N-Harz liegt in diesem pH-Bereich der Dissoziationsgrad um 25 % höher als beim A-Harz (s. Abb. 1 u. Tab.4).

Der Dissoziationsgrad der Chymotrypsin-Inhibitorharz-Komplexe beträgt bereits bei pH 7,8 14 % (N-Harz) bzw. 15,6 % (A-Harz) und steigt beim N-Harz bis zu 53 %, beim A-Harz bis 25,8 %. Das Chymotrypsin ist bereits bei pH 4,1 maximal dissoziiert (s. Abb. 2 u. Tab. 5). Der leichte Abfall der Dissoziationskurven zum pH 3,1 ist wahrscheinlich die Folge eines Denaturierungseffektes.

Bei dem Kallikrein-Inhibitorharz-Komplex erfolgte nach dem ersten Bindungsschritt keine Dissoziation, nach dem zweiten Bin-

dunessschritt dissoziierte im Batchverfahren (0,5 M Guanidin-HCl, 0,2 M NaAc, pH 6) nur ein kleiner Teil.

2. Isolierung und Reinigung von Pankreas-Kallikrein des Schweines

a. Guanidinierung des TK-Inhibitors

Die Versuchsdurchführung war wie in III.1.a beschrieben, der Ansatz erfolgte mit dem 10ten Teil der Substanzen.

Es wurden 200 mg TK-Inhibitor (Bayer SK/T 22/3, spezif. Aktivität: 2700 mIU/mg) zweimal mit 7,2 g O-Methylisoharnstoff umgesetzt analog 1.a. Die Gefriertrocknung ergab 185 mg guanidinierten TK-Inhibitor (spezif. Aktivität: 2400 mIU/mg).

b. Aminosäureanalyse des guanidinierten TK-Inhibitors

Zum Nachweis der Guanidinierung des TK-Inhibitors wurden nach einer 20-Stunden-Hydrolyse von 200 µg des Inhibitors in 6 N HCl, 110° C, die entscheidenden Aminosäurewerte ermittelt:

Lys	0,28	Das Resultat war zufriedenstellend, denn
His	0,24	der Lysinwert von 0,28 ist kaum höher
Arg	6,0	als der Histidinwert (theoretischer His-
Homoarg	(5,2)	Wert im TK-Inhibitor: 0,00 . Siehe auch
		Tab. 1).

c. Herstellung eines polyamphoteren Inhibitorharzes

Ansatz: 500 mg Cellulosehydrazid (Merck) wurden in das Celluloseazid umgewandelt (siehe III.1.d: alle Substanzen wurden im gleichen Mengenverhältnis zugegeben wie dort, bezogen auf mg Cellulose-träger). Anschließend folgte die Bindung von 150 mg guanidinierten TK-Inhibitor (360 IU) an den wasserunlöslichen Träger, 30 min danach wurden 5 ml 0,5 M NH_4Cl zu der Suspension gegeben.

Die gesammelten Überstände der Waschpuffer enthielten eine Inhibitoraktivität von 67 IU (BAPNA-Test).

Das Inhibitorharz wurde dann mit dem 5-fachen Volumen Cellulosepulver gemischt, in eine gekühlte (0° C) Säule (1,5 x 10 cm) gegeben und gründlich mit Salz - Pufferlösungen gewaschen.

d. Affinitätschromatographie an dem wasserunlöslichen Inhibitorharz

Alle Arbeitsgänge an dem Inhibitorharz erfolgten in einer Säule (1,5 x 10 cm) bei 0° - 4° C, die Wasch- und Elutionspuffer waren jeweils mit Chloroform gesättigt.

Ausgangsmaterial: Ein vorgereinigtes Pankreas-Kallikrein der Firma Bayer (Präparat SK/K 187, spez. Aktivität: 14,5 U/mg Einwaage).

Bindung: Die Kallikreinproben (2140 - 8365 U) wurden in 2,5 bis 17,5 ml 0,4 M Puffer (0,3 M NaCl, 0,1 M TRA, pH 8) gelöst. Die Enzymlösung wurde langsam auf die Inhibitorharz-Cellulose-Säule aufgebracht (ca. 0,5 - 1 Stunde) und anschließend mit der erwähnten 0,4 M Salz-Pufferlösung nichtgebundenes Kallikrein und Begleitsubstanzen ausgewaschen (s. Tab. 7 und 8, Abb. 3).

Dissoziation und Ablösung: Die Dissoziation des Kallikrein-Inhibitorharz-Komplexes und Elution des Enzyms wurde mit 0,2 bis 1 M Guanidinhydrochlorid, 0,2 - 0,3 M Pufferlösung, pH 4,5 bis 8, vorgenommen (s. Tab. 7 und 8).

Erläuterungen zu den einzelnen Versuchen:

Säule 1-11: In allen Versuchen wurde zum Lösen des Kallikreins und Waschen der Säulen die gleiche 0,4 M Salz-Pufferlösung verwendet (s. oben).

Nach je zwei Säulenversuchen wurde das Inhibitorharz aufgerührt und mit 0,3 M KCl, pH 2, gewaschen.

Säule 1 - 5: pH-Wert (und Molarität) wurden während eines Säulenversuches umgestellt, um optimale Dissoziations- und Elutionsbedingungen herauszufinden.

Säule 6, 7: Das Kallikrein wurde in verschiedenen Volumina des Puffers gelöst und die Säulen 18 - 19 Stunden gewaschen (alle anderen Säulen 0,2 - 2 Stdn.), der Waschpuffer fraktioniert und ausgetestet. Mit diesem Versuch sollte Bindungskapazität und Dissoziationsverhalten Inhibitorharzes bzw. des Harz-Enzym-Komplexes in Abhängigkeit der aufgezogenen Kallikreinkonzentration/ml und der Dauer des Waschvorganges bestimmt werden (s. Abb. 3, Tab. 7).

Säule 8, 9: Das Dissoziationsverhalten des Kallikrein-Inhibitor-Komplexes wurde bei verschiedenen Molaritäten der Guanidin-HCl-Lösungen (0,25 bzw. 1 M) untersucht. Bei Säule 8 betrug die Elutionsdauer 30, bei Säule 9 15 Stdn. (bei den anderen Säulen 9 - 15 Stdn., s. Tab. 7 u. 8).

Säule 9,10,11: Das Eluat wurde in der 3-4fachen Menge dest. Wasser aufgefangen, um Denaturierung des Kallikreins durch 1 M Guanidin-HCl zu verhindern.

Tab. 7: Bindung und Ablösung von Pankreas-Kallikrein an bzw. von einem polyamphoteren TK-Inhibitorharz (s. ergänzend Tab.8). Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 0° - 4° C, sämtliche Salz-Pufferlösungen waren mit Chloroform gesättigt (Erläuterungen zu den einzelnen Versuchen siehe unter 2.d).

Säule (1,5 x 10 cm) = Versuchs.-Nr.	Aufgetragen auf d.Säule (U)	Pankreas-Kallikrein in (ml)	Pankreas-Kallikrein		Eluiert nach Dissoz. (%) ^a
			Aktivität im Waschpuffer (U)	Gebunden vom Inhibitorharz (U)	
1	8365	8	4698	3667	---
2	4110	10,5	1135	2975	30
3	5569	7	3352	2217	65,5
4	4029	5	2076	1953	74
5	4500	17,5	3455	1045	62
6	2140	2,5	475	1665	64
7	2470	10	790	1680	70
8	2300	2,5	202	2100	66
9	2610	2,5	236	2374	68
10	2300	2,5	247	2050	72
11	2300	2,5	360	1940	88

^a: Eluiertes Kallikrein in % des gebundenen

Tab. 8: Elution von Pankreas-Kallikrein nach Dissoziation des Enzym-TK-Inhibitorharz-Komplexes (ergänzend zu Tab. 7).

Säule =Vers.Nr.	pH-Wert	Dissoziations- und Elutionslösung				
		TRA	Na-Acetat Molarität (M)	Guan.- HCl	Eluiertes Volumen (ml)	Eluierte Aktivität (%) ^x
1 a	4,5	-	0,2	-		---
b	4,5	-	0,2	0,5		---
2 a	4,5	-	0,2	0,5	43	8
b	5,6	-	0,2	0,5	95	22
3 a	8	0,3	-	0,5	51	6,5
b	7	0,3	-	0,5	43	9
c [±]	<u>6</u>	-	0,2	0,5	71	<u>55</u>
4 a	7	0,3	-	0,5	117	20
b [±]	<u>6</u>	-	0,2	0,5	145	<u>35</u>
5 a	7	0,3	-	0,5	160	18,5
b [±]	6	-	0,2	0,5	188	25
8	6	-	0,2	0,25	3000	66
9	6	-	0,2	1	1300	68

^x: Eluiertes Kallikrein in % des gebundenen

[±]: Säule 3,4,5: Nur die erste Portion des Eluates bei pH 6 wurde in Tab. 8 aufgeführt, um mit der Aktivität/Elutionsvolumen bei den anderen pH-Werten vergleichen zu können..

Ergänzungen zu Tab 8:

Säule 6,7 (s. Tab 7): Elutionspuffer (0,5 M Guanidin-HCl, 0,2 M Na-Acetat, pH 6)

Säule 10, 11 (s. Tab. 7): Elutionspuffer (1 M G.-HCl, 0,2 M NaAc, pH 6). Die Elutionsdauer betrug bei Säule 8 30 Stdn., bei Säule 9 15 Stdn., bei allen anderen Säulen 9 - 15 Stdn.

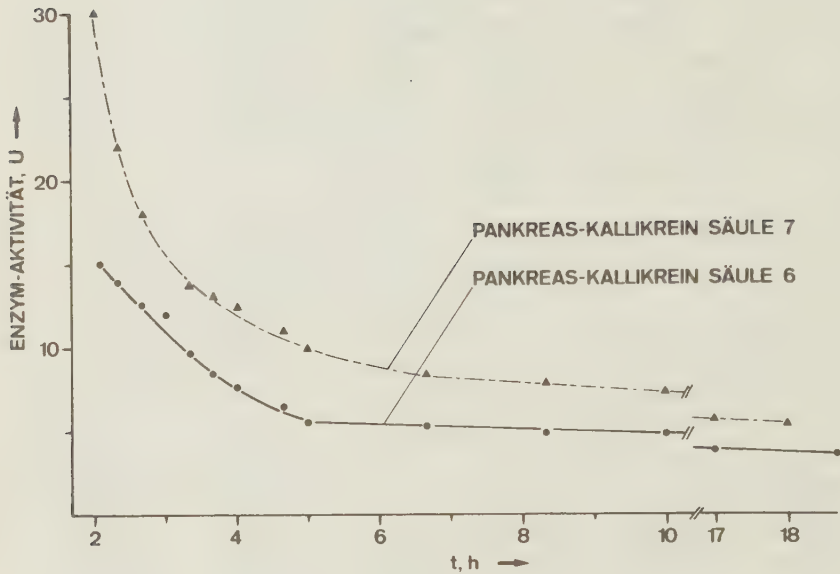


Abb. 3: Bindungs- und Dissoziationsverhalten des Kallikrein-TK-Inhibitorharz-Komplexes während eines Waschvorganges in Abhängigkeit von der aufgezogenen Kallikrein-konzentration/ml.

Waschpuffer: 0,3 M NaCl, 0,1 M TRA, pH 8

Abszisse: Dauer des Waschvorganges (Std.)

Ordinate: Kallikrein-Aktivität im Waschpuffer (U)

Säule 6: 2140 U/ 2,5 ml (—●—●—)

Säule 7: 2470 U/ 10 ml (- - - ▲ - - -)

Säule 10: Die Kallikrein-Aktivität wurde im Eluat vor und nach Entfernen der Guanidinsalze bestimmt, da diese u.U. den Aktivitätsverlust (s. Tab. 7) bewirkten. 150 ml des Eluates wurden 7 Stunden in der Kälte gegen 12 l 0,5 M NaCl-, 0,02 M Ammoniumacetatlösung dialysiert.

Aufarbeitung der Eluate:

Der größte Teil der Eluate (3900 U) von Säule 2, 3 und 4 wurde vereinigt, gegen schwache Ammoniumacetatlösung, pH 7, dialysiert, eingeengt und entsalzt durch Ultrafiltration (Amicon, Filter UM 10) und abschließend lyophilisiert. Das erhaltene Präparat (28 mg) hatte im Enzymtest eine spezifische Aktivität von 112 U/mg Einwaage und im Spektralphotometer ("Leitz Unicam SP-825", Schichtdicke: 1 cm, gemessen bei 280 nm) 59 U/1,0 E.

Die Eluate von Säule 5 - 11 wurden vereinigt und weiterbehandelt wie oben, aber nach der Gefriertrocknung war das Kallikreinpräparat noch zu salzhaltig (daher Aktivitätsverlust durch die Guanidinsalze). Es wurde daher in dest. Wasser plus etwas Ammoniak, pH 7, gelöst und über Sephadex G-50 (3 x 50 cm) gegeben. Nach Eingengung (Amicon, UM 20) und Lyophilisation wurden 35,8 mg weißes lockeres Pulver erhalten, mit einer spezifischen Aktivität von 90 U/mg Einwaage im enzymatischen Test und 55 U/1 E (gemessen im Spektralphotometer).

e. Ergebnisse aus den einzelnen Versuchen mit dem Inhibitorharz

aa: Nach 3maligem Gebrauch des wasserunlöslichen Inhibitorharzes ist eine konstante Bindungskapazität erreicht, die sich selbst nach weiteren acht Versuchen nicht verändert hatte.

bb: Nach dem ersten Bindungsschritt wurde überhaupt kein Pankreas-Kallikrein eluiert (vergleiche auch Harzversuch III.1.h.), die Ausbeute nach dem zweiten Versuch lag auch noch sehr niedrig, stellte sich aber dann auf relativ gleichmäßige Werte ein. (s. Tab. 7)

cc: Der Verlust an Kallikreinaktivität lag von Säule 3 - 11 im Durchschnitt bei 30 % (12-38 %). Die Vermutung, daß Guanidinsalze diesen Aktivitätsverlust bewirken (Beobachtung von FRITZ u.a., 129) wurde in diesem Fall nicht bestätigt, denn die Aktivi-

tät des Eluates 10 war vor und nach Entfernen der Guanidinsalze gleich hoch.

dd: Am stärksten dissoziierte der Kallikrein-Inhibitor-Komplex bei pH 6 (s. Säule 2,3,4 in Tab. 8) und 1M Guanidinsalzlösungen. Die Ausbeute bei Säule 8 und 9 liegt zwar gleich hoch (s. Tab. 7 und 8), aber nach 30 Stunden Elution bei Versuch 8 (0,25 M Guanidin-HCl) waren in 0,1 ml Eluat noch 20 mU Aktivität, nach 15 Stunden bei 9 (1 M Guan.-HCl) in 0,1 ml noch 4 mU.

ee: Die Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes setzt bereits bei pH 8 ein, dies wird deutlich in Versuch 6 und 7, Abb. 3. Nach Auswaschen des nicht gebundenen Kallikreins nähert sich der Dissoziationsgrad einem fast konstantem Wert und liegt sichtlich tiefer, wenn die aufgezogene Enzymlösung konzentrierter ist (Säule 6: 2140 U/2,5 ml, Säule 7: 2470 U/10 ml). Infolge der geringeren Dissoziation ist daher die

ff: Bindungskapazität höher, wenn konzentrierter aufgetragen wird. Dies zeigt Versuch 5 besonders deutlich, auch im Versuch 7 sind 300 U mehr im Waschpuffer als bei Säule 6 (s. Tab. 7). Infolge der Dissoziation nimmt die Bindungskapazität auch ab bei längerer Waschdauer (18 - 19 Stdn. im Versuch 6 und 7 gegenüber 0,2 bis 2 Stdn. bei den anderen Säulen, s. Tab. 7).

gg: Die höchste Ausbeute wurde in Versuch 9 - 11 erzielt, zur Dissoziation des Komplexes wurde 1 M Guanidin-HCl, 0,2 M Na-acetat, pH 6, verwendet, die Eluate wurden in dem 3fachen Volumen dest. Wasser aufgefangen.

hh: Das Ausgangsmaterial hatte eine spezifische Aktivität von 14,5 U/mg Einwaage, bei dem Pankreas-Kallikrein aus Versuch 2, 3 und 4 betrug sie 112 U/mg und 59 U/1 E im Spektralphotometer (gemessen bei 280 nm), bei dem Präparat aus Versuch 5 - 11 90 U/mg und 55 U/1 E. Das Ergebnis dieser Einschnitt-Reinigungsmethode durch Affinitätschromatographie ist sehr zufriedenstellend, die Aktivität der reinsten Fraktionen aus dem Hydroxyl-apatit-Verfahren betrug bei Pankreas-Kallikrein 70,6 U/1 E (111).

3. Isolierung und Reinigung von Submandibularis-Kallikrein des Schweines

a. Ausgangsmaterial

Von der Fa. Bayer wurde aus Schweinesubmandibularisdrüsen durch Fällung mit Aceton (Kieselgur als Filterhilfsmittel) ein Kallikrein-Adsorptionspulver mit einer Aktivität von 0,98 KE/mg hergestellt. In unserem Labor wurde durch Fraktionierung an DEAE-Cellulose im Batch-Verfahren ein Präparat mit 1,75 U/mg gewonnen. Dieses war Ausgangsmaterial für die folgenden Versuche. Infolge der geringen spezifischen Aktivität konnten die Kallikreinproben nur in größeren Puffermengen gelöst werden, was nach den Versuchen mit Pankreas-Kallikrein nachteilig erschien. Das Einengen dieser Lösungen durch Ultrafiltration war wegen der hohen Konzentration und Viskosität nicht möglich. Zusätzlich war vor dem Bindungsschritt an das Harz eine Zentrifugation (15 min Ultrazentrifuge, 25000 U/min) der Enzymlösungen (Kallikreinpräparat gelöst in 0,1 M TRA, 0,3 M NaCl, pH 7,8) notwendig, um unlösliche Begleitstoffe abzutrennen. Den Kallikrein-Lösungen wurde zur Verhinderung des Bakterienwachstums etwas Pentachlorphenol zugesetzt.

Zu diesen Reinigungsversuchen wurde das wasserunlösliche TK-Inhibitorharz verwendet, das bereits zur Pankreas-Kallikrein-Isolierung benützt worden war, in der Zwischenzeit (ca. 2,5 Monate) wurde es gekühlt aufbewahrt.

b. Affinitätschromatographie an dem wasserunlöslichen Inhibitorharz

Alle Arbeitsschritte wurden bei 0° - 4° C durchgeführt, die Wasch- und Elutionspuffer waren jeweils mit Chloroform gesättigt.

Bildung des wasserunlöslichen Kallikrein-Inhibitorharz-Komplexes: Die Lösungen des Kallikreinpräparates (6,5 - 12 ml) in 0,4 M Salzpuffer (0,3 M NaCl plus 0,1 M Triäthanolamin), pH 7,8, wurden mit dem Inhibitorharz (aufgerührte Suspension in 15 - 20 ml von dem erwähnten Puffer) versetzt und die Mischung 15 - 20 min kräftig gerührt, danach in eine Säule (1,5 x 10 cm) gegossen und ca. 45 min mit obigen Salzpuffer gewaschen (s. Tab.9).

Tab. 9: Bindung von Submandibularis-Kallikrein an ein polyamphotes Inhibitorharz im Batchverfahren und Ablösung in einer Säule (1,5 x 10 cm).

Die Harzsuspension plus Kallikreinlösung (Salzpuffervolumen betrug insgesamt 20 - 25 ml, 0,4 M, pH 7,8) wurde 15 - 20 min gerührt, zur Ablösung wurde 1,2 M Guanidin-Puffer, pH 6, verwendet (Vers.beschr. s. III.3.b).

Säule =Vers.Nr.	Submandibularis-Kallikrein		
	Umgesetzt mit dem Harz im Batchverfahren (U)	Gebunden von Harz (U)	Eluiert in der Säule (%) ^a
1	1050	650	92
2	1100	500	96
3	670	470	92
4	700	320	91
5	475	225	93

a: Eluiertes Kallikrein in % des gebundenen

Dissoziation des Harzkomplexes: Nach Erfahrungen mit Pankreas-Kallikrein wurde die Dissoziation des Enzym-Harzkomplexes und die Elution des Submandibulariskallikrein jeweils mit 1,2 M Guanidin-Puffer 1 M Guanidin-hydrochlorid, 0,2 M Na-acetat), pH 6, vorgenommen. Jede Säule wurde mit 400 - 500 ml des Guanidinpuffers (Serva, Biomol) eluiert, das Eluat in dem 3 - 4-fachen Volumen dest. Wasser aufgefangen (s. Tab. 9).

Zwischen den einzelnen Versuchen wurde das Harz aufgerührt und gründlich mit 0,3 M KCl-Lösung, pH 2, gewaschen, da es durch die verunreinigten Kallikreinlösungen nach jedem Bindungs- bzw. Dissoziationsschritt stark verschmutzt war.

Aufarbeitung der Eluate: Die Eluate von Versuch 1 - 3 wurden vereinigt (mit Wasservorlage ca. 7 l), zur Entfernung der Guanidinsalze 12 Stunden in der Kälte gegen 50 l dest. Wasser dialysiert, anschließend im Rotationsverdampfer (Wasserbad 25° - 30° C)

auf 1 Liter eingeengt, danach nochmals 8 Stunden gegen 15 l dest. Wasser dialysiert, um eine Denaturierung des Kallikreins durch zu hohe Guanidinsalzkonzentrationen zu verhindern und abschließend wurde das weitgehend entsalzte Eluat auf 50 ml einkonzentriert.

c. Entsalzung und Fraktionierung an Sephadex G-50 bzw. G-75

Zur vollständigen Entsalzung wurden die 50 ml Kallikreineluat über eine Sephadex-G-50-Säule (3 x 100 cm, Elutionslösung: dest. Wasser plus Ammoniak, pH 7,5) gegeben. Die Lyophilisierung ergab 18 mg eines noch schwach bräunlich gefärbten Pulvers (spezif. Aktivität: 60 U/mg). Daher wurde das Submandibularis-Kallikrein an Sephadex G-75 (3 x 120 cm, Puffer: 0,5 M Ammoniumacetat, pH 7,4) rechromatographiert, der kallikreinhaltige Peak eingeengt (Ultrafiltration, Filter: UM 20 E) und über Sephadex G-50 (3 x 100 cm, Elutionslösung: dest. Wasser plus NH_3 , pH 7,5) entsalzt. Das lyophilisierte Präparat hatte eine spezifische Aktivität von 70 U/mg, die Messung im Leitz Unicam bei 280 nm ergab 45,5 U/1 E. Die biologische Methode der Aktivitätsbestimmung am Hund (s. II.1.b) ergab folgenden Zusammenhang zwischen enzymatischer und biologischer Aktivität:

$$1 \text{ U} = 15 \text{ KE Submandibularis-Kallikrein}$$

d. Aminosäureanalyse des gereinigten Submandibularis-Kallikrein

Nach dem unter C.II.6 beschriebenen Verfahren wurde von dem durch Affinitätschromatographie isolierten Kallikreinpräparat aus Submandibularisdrüsen eine Aminosäureanalyse durchgeführt. Das Ergebnis der Aminosäureanalyse zeigt Tab. 10. Die zum Vergleich angegebenen Aminosäurewerte des Pankreas-Kallikreins stellen Mittelwerte aus 3 Analysen dar, die an 2 über Hydroxylapatit gereinigten Kallikreinpräparaten und einem Sialinsäurefreien Kallikreinpräparat aus Schweinepankreas durchgeführt wurden (111).

Tab. 10: Aminosäureanalyse des mit einem polyamphoteren TK-Inhibitorharz gereinigten Submandibularis-Kallikreins. Angaben in Mol Aminosäure pro Mol Kallikrein. Zum Vergleich ist die Aminosäurezusammensetzung des Kallikreins aus Schweinepankreas angegeben. Hydrolyse: 20 Stdn. in 6 N HCl, 110° C.

	Submandibularis-Kallikrein	Pankreas-Kallikrein
Asp	33,00	33
Thr	18,30	18
Ser	16,48	17
Glu	27,22	28
Pro	19,12	20
Gly	26,58	27
Ala	16,70	16
Cys 1/2	---	10
Val	11,15	13
Met	---	5
Ile	(23,13)	14
Leu	(31,06)	24
Tyr	5,70	9
Phe	12,29	13
Lys	12,77	13
His	11,23	10
Arg	4,64	4

Cys, Meth, Ile, Leu: Wegen eines Integrationsfehlers konnten die Ergebnisse nicht ausgewertet werden bzw. nur ungefähr handkorrigiert angegeben werden.

Val, Arg: Diese AS sind erst nach 120 Stdn. Hydrolyse voll freigesetzt.

auf 1 Liter eingeeengt, danach nochmals 8 Stunden gegen 15 l dest. Wasser dialysiert, um eine Denaturierung des Kallikreins durch zu hohe Guanidinsalzkonzentrationen zu verhindern und abschließend wurde das weitgehend entsalzte Eluat auf 50 ml eingeengt.

c. Entsalzung und Fraktionierung an Sephadex G-50 bzw. G-75

Zur vollständigen Entsalzung wurden die 50 ml Kallikreineluat über eine Sephadex-G-50-Säule (3 x 100 cm, Elutionslösung: dest. Wasser plus Ammoniak, pH 7,5) gegeben. Die Lyophilisierung ergab 18 mg eines noch schwach bräunlich gefärbten Pulvers (spezif. Aktivität: 60 U/mg). Daher wurde das Submandibularis-Kallikrein an Sephadex G-75 (3 x 120 cm, Puffer: 0,5 M Ammoniumacetat, pH 7,4) rechromatographiert, der kallikreinhaltige Peak eingeeengt (Ultrafiltration, Filter: UM 20 E) und über Sephadex G-50 (3 x 100 cm, Elutionslösung: dest. Wasser plus NH_3 , pH 7,5) entsalzt. Das lyophilisierte Präparat hatte eine spezifische Aktivität von 70 U/mg, die Messung im Leitz Unicam bei 280 nm ergab 45,5 U/1 E. Die biologische Methode der Aktivitätsbestimmung am Hund (s. II.1.b) ergab folgenden Zusammenhang zwischen enzymatischer und biologischer Aktivität:

$$1 \text{ U} = 15 \text{ KE Submandibularis-Kallikrein}$$

d. Aminosäureanalyse des gereinigten Submandibularis-Kallikrein

Nach dem unter C.II.6 beschriebenen Verfahren wurde von dem durch Affinitätschromatographie isolierten Kallikreinpräparat aus Submandibularisdrüsen eine Aminosäureanalyse durchgeführt. Das Ergebnis der Aminosäureanalyse zeigt Tab. 10. Die zum Vergleich angegebenen Aminosäurewerte des Pankreas-Kallikreins stellen Mittelwerte aus 3 Analysen dar, die an 2 über Hydroxylapatit gereinigten Kallikreinpräparaten und einem Sialinsäurefreien Kallikreinpräparat aus Schweinepankreas durchgeführt wurden (111).

Tab. 10: Aminosäureanalyse des mit einem polyamphoteren TK-Inhibitorharz gereinigten Submandibularis-Kallikreins. Angaben in Mol Aminosäure pro Mol Kallikrein. Zum Vergleich ist die Aminosäurezusammensetzung des Kallikreins aus Schweinepankreas angegeben. Hydrolyse: 20 Stdn. in 6 N HCl, 110° C.

	Submandibularis-Kallikrein	Pankreas-Kallikrein
Asp	33,00	33
Thr	18,30	18
Ser	16,48	17
Glu	27,22	28
Pro	19,12	20
Gly	26,58	27
Ala	16,70	16
Cys 1/2	---	10
Val	11,15	13
Met	---	5
Ile	(23,13)	14
Leu	(31,06)	24
Tyr	5,70	9
Phe	12,29	13
Lys	12,77	13
His	11,23	10
Arg	4,64	4

Cys, Meth, Ile, Leu: Wegen eines Integrationsfehlers konnten die Ergebnisse nicht ausgewertet werden bzw. nur ungefähr handkorrigiert angegeben werden.

Val, Arg: Diese AS sind erst nach 120 Stdn. Hydrolyse voll freigesetzt.

e. Ergebnisse aus den Reinigungsversuchen mit dem Inhibitorharz

.aa. In Versuch 1 - 5 ist ein deutlicher Abfall der Bindungskapazität feststellbar, diese lag bereits bei Säule 1 niedriger als bei der Reinigung des Pankreas-Kallikreins (s. Tab. 7 u. 9).

bb. Der Verlust an Kallikreinaktivität betrug im Durchschnitt 7 % gegenüber 30 % beim Kankreas-Kallikrein, dort zeigte aber bereits Säule 9 und 10 unter den optimalen Bedingungen (1 M Guanidin-HCl, 0,2 M Na-acetat, pH 6, Wasservorlage) einen ständig abnehmenden Verlust (s. Tab. 7 u. 9).

cc. Das Ausgangsmaterial hatte eine spezifische Aktivität von nur 1,75 U/mg, nach Affinitätschromatographie und Entsalzung über Sephadex G-50 betrug sie 60 U/mg, das bedeutet einen 34fachen Anstieg der Aktivität mit der Einschrittmethode. Durch Rechromatographie ließ sich der Reinheitsgrad noch um 15 % erhöhen.

dd. Die Aminosäureanalyse des gereinigten Submandibularis-Kallikreins ergab eine überraschende Ähnlichkeit mit der Aminosäurezusammensetzung des Pankreas-Kallikreins. Eine Reihe von Werten war nahezu identisch.

4. Vergleich der Hemmwirkung des nativen und des guanidinierten Trypsin-Kallikrein-Inhibitors gegenüber dem gereinigten Pankreas- bzw. Submandibularis-Kallikrein

In dem guanidinierten TK-Inhibitor (Synonym: Homoarginin-Trasylol in Abb. 4 u. 5) ist u.a. der Lys-15-Rest, der das aktive Zentrum des Inhibitors darstellt, in Homoarginin umgewandelt worden. Die Aktivitätsbestimmungen des Inhibitors vor und nach der Guanidiniierungsreaktion (Versuch III.1.a und 2.a) zeigten gleiches Hemmverhalten gegenüber Trypsin (BAPNA-Test), die folgenden Versuche sollten Hemmung der beiden Inhibitor-derivate gegenüber Kallikrein und damit die Komplexbildung untersuchen.

a. Quantitativer Nachweis der Hemmung von Kallikrein

Bedingungen: Nach der unter II.4.a beschriebenen Methode wurden 0,1 ml der Kallikreinlösung (das sind 9,4 - 10,2 mU des Pankreas-Kallikreins aus Versuch 5 - 11 und des Submandibularis-Kallikreins aus Versuch 1 - 3) mit der Inhibitorlösung (0,0125 bis 0,35 µg nativer TK-Inhibitor, 0,025 - 0,45 µg guanidiniertes Inhibitor plus 0,2 M TRA-Puffer) versetzt und 15 min bei 25° C inkubiert. Danach wurde die verbleibende Aktivität enzymatisch bei 366 nm im optischen Test bestimmt. Den Verlauf der Meßreihen geben die Hemmkurven wieder (Abb. 4 und 5).

b. Ergebnisse der Hemmkurven

aa. Abb. 4: Der native TK-Inhibitor hemmt Pankreas-Kallikrein signifikant stärker als Submandibularis-Kallikrein, einer 50 %igen Hemmung des Pankreas-Kallikreins entspricht eine 23 %ige Inhibition des Kallikreins aus Submandibularisdrüsen. Die Hemmung des Pankreas-Kallikreins erfolgt linear bis 50 %, die des Submandibularis-Kallikreins bis 35 %.

bb. Abb. 5: Der guanidinierte TK-Inhibitor hemmt Pankreas- und Submandibularis-Kallikrein praktisch gleich stark, die Hemmkurve ist bei Submand.-Kallikrein sogar etwas steiler.

cc. Vergleicht man Abb. 4 und 5, so wird deutlich, daß der guanidinierte TK-Inhibitor Pankreas-Kallikrein schwächer hemmt

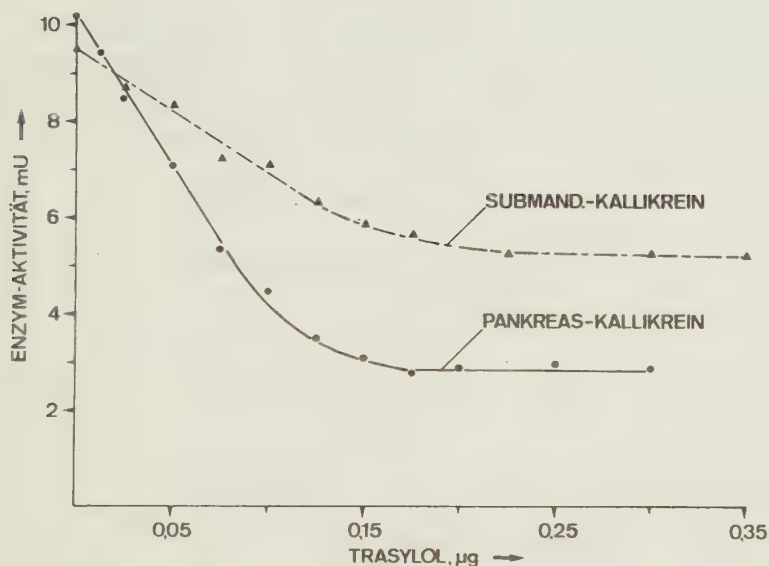


Abb. 4: Hemmung von Pankreas- und Submandibularis-Kallikrein durch den nativen TK-Inhibitor (Trasyolol^R)

Abszisse: Zum Ansatz zugegebene Menge Trasyolol in µg

Ordinate: Kallikrein-Aktivität in mU nach Zugabe der jeweiligen Inhibitormengen

Pankreas-Kallikrein: 90 U/mg (Säule 5 - 11)

Submand.-Kallikrein: 70 U/mg (Säule 1 - 3)

Trasyolol (Fa. Bayer): 2530 U/mg (BAPNA-Test)

Substrat im Kallikrein-Test: BAEE in Kombination mit ADH

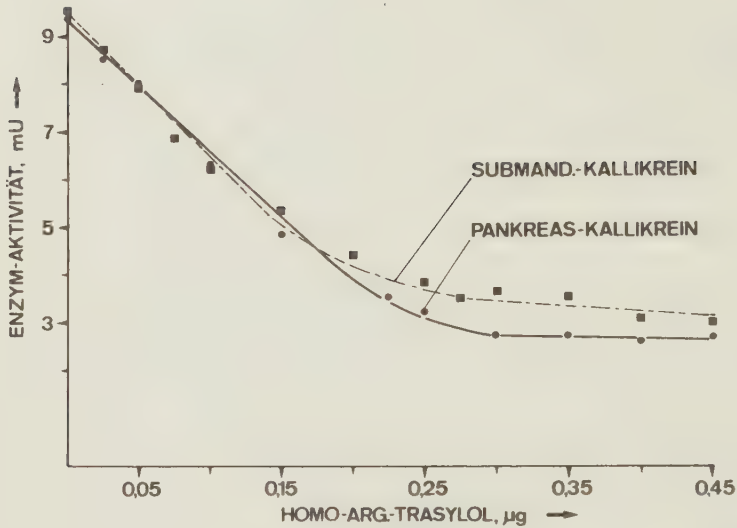


Abb. 5: Hemmung von Pankreas- und Submandibularis-Kallikrein durch den guanidinierten TK-Inhibitor (= Homoarginin-Trasylole)

Abszisse: Homoarginin-Trasylole in µg

Ordinate: Kallikrein-Aktivität in mU nach Zugabe der jeweiligen Inhibitormengen

Pankreas-Kallikrein: 90 U/mg

Submand.-Kallikrein: 70 U/mg

Homoarginin-Trasylole: 3160 mIU/mg

als der native. 0,05 μ g nativer Inhibitor bewirken eine 24 %ige, 0,1 μ g eine 58 %ige Hemmung des Pankreas-Kallikreins, dagegen inhibieren 0,05 μ g des guanidinierten Inhibitorderivates nur 13 %, 0,1 μ g 28 % des eingesetzten Pankreas-Kallikreins. Im linearen Bereich hemmt der native TK-Inhibitor also das Pankreas-Kallikrein ca. doppelt so stark wie der guanidinierte Inhibitor.

Die Hemmwirkung des guanidinierten Inhibitors gegenüber Submandibularis-Kallikrein ist im linearen Bereich etwas stärker als die des nativen, bei ersterem erfolgt die Hemmung linear bis 45 %, bei dem nativen TK-Inhibitor bis 35 %.

IV. Diskussion

Die Aminosäureanalyse des guanidinierten TK-Inhibitors ergab, daß alle Lysinreste in Homoargininreste umgewandelt sind (III.1. c, 2.b). Die Bestimmung der Hemmaktivität der Inhibitoren im BAPNA-Test zeigte vor und nach der Guanidiniierungsreaktion gleiches Hemmverhalten gegenüber Trypsin, d.h. also, das reaktive Zentrum bleibt bei der chemischen Modifizierung erhalten. Die Versuche unter III.4 zeigen weiterhin, daß der guanidinierte Inhibitor Pankreas-Kallikrein um etwa 50 % schwächer hemmt als der native, gegenüber Submandibularis-Kallikrein ist die Hemmstärke der beiden Inhibitor-derivate aber annähernd gleich groß.

Der guanidinierte TK-Inhibitor wird gut von Celluloseazid gebunden. Infolge der hohen Basizität des Inhibitors ist das Bindungsvermögen des polyanionischen Harzträgers gegenüber dem TK-Inhibitor doppelt so hoch (89 %) wie das des polyamphoteren Trägers (42 %), in dem die negative Ladung des Harzgerüsts durch den Einbau basischer Gruppen abgeschwächt ist (s. Tab. 3).

Die Bindungsversuche mit Trypsin zeigen, daß der gesamte gebundene TK-Inhibitor im polyamphoteren N-Harz und im polyanionischen A-Harz zur Komplexbildung mit dem Enzym fähig ist. Die reaktiven Zentren der Inhibitor-moleküle sind also auch nach der Bindung an den wasserunlöslichen Träger voll aktiv, weil der guanidinierte Inhibitor nicht in der Nähe seines aktiven Zentrums gebunden werden kann. Wahrscheinlich ist er über die nicht guanidinierte N-terminale -Aminogruppe oder über aromatische Aminosäurereste fixiert.

Die Untersuchungen ergaben weiterhin, daß die Bindungskapazität gegenüber Enzymen und auch das Dissoziationsverhalten der Enzym-Inhibitorharz-Komplexe beeinflusst wird vom Ladungscharakter des Harzgerüsts und des betreffenden Enzyms. So besitzt das polyamphotere N-Harz erwartungsgemäß ein deutlich höheres spezifisches Bindungsvermögen gegenüber dem negativ geladenen Kallikrein als das polyanionische A-Harz (s. Tab. 6).

Die im Harzgerüst des polyamphoteren Inhibitorharzes vorhandenen basischen Gruppen begünstigen auch die Dissoziation der Enzym-Inhibitorharz-Komplexe. Der Dissoziationsgrad der N-Inhibitorharz-Komplexe mit Trypsin bzw. Chymotrypsin ist unter vergleichbaren Bedingungen um 25 % bzw. 50 % höher als der der ent-

sprechenden A-Inhibitorharz-Komplexe (s. Tab. 4, 5 und Abb. 1,2).

Während praktisch 100 % des wasserunlöslichen guanidinierten TK-Inhibitors Trypsin gebunden haben, sind bei der Komplexbildung mit Pankreas-Kallikrein 10 % des Inhibitors im N-Harz, 7,3 % im A-Harz aktiv (Tab. 6). Außer der stark negativen Ladung der Kallikreine wirkt sich sicher ihre Molekülgröße und der dadurch bedingte sterische Effekt hemmend auf das spezifische Bindungsvermögen der Inhibitorharze aus.

Auf Grund ihres starken Hemmverhaltens gegenüber Trypsin wären die wasserunlöslichen Derivate des guanidinierten TK-Inhibitors somit ideal geeignet für die Trypsinisolierung. Aber auch Hemmwirkung und spezifisches Bindungsvermögen des polyamphoteren Inhibitorharzes gegenüber Pankreas-Kallikrein und Submandibularis-Kallikrein reicht aus, um diese Enzyme in ausreichendem Maße zu isolieren.

Um die N-Inhibitorharz-Komplexe mit den säurelabilen Kallikreinen zu dissoziieren, genügt bereits ein 0,45 M Guanidinsalzpuffer (0,25 M Guanidin-HCl, 0,2 M NaAcetat) von pH 6. Eventuell bewirken die stark positiven Guanidiniumionen eine reversible Denaturierung (Hemmung) der Kallikreine und somit eine ausreichende Schwächung der spezifischen, für die Komplexbildung verantwortlichen Kräfte (Tab. 7, 8 u. 9).

Die Isolierung der Organ-Kallikreine durch Affinitätschromatographie verlief im Prinzip recht zufriedenstellend (s. Ergebnisse III.2 und 3). Das Pankreas-Kallikrein, das mit dieser Einschritt-Methode isoliert wurde, hatte eine spezifische Aktivität von 112 U/mg bzw. 59 U/1 E (Extinktion bei 280 nm, gemessen mit dem Spektralphotometer), während die Aktivität der reinsten Fraktionen aus dem Hydroxylapatit-Verfahren bei Pankreas-Kallikrein 70,6 U/1 E betrug. Beim Submandibularis-Kallikrein lag die erzielte Reinheit bei 70 U/mg bzw. 45,5 U/1 E. Wahrscheinlich lag die spezifische Aktivität dieses isolierten Präparates niedriger, weil die Ausgangsaktivität nur 1,75 U/mg betrug; das bedeutet immerhin einen 40fachen Anstieg der Aktivität.

Bei Vergleich der Aminosäureanalyse des durch Affinitätschromatographie gereinigten Kallikreinpräparates aus Submandibularisdrüsen mit der mittleren Aminosäurezusammensetzung dreier Kallikreinpräparate aus Schweinepankreas (111) fällt eine bemerkenswerte Übereinstimmung auf. Diese Ähnlichkeit spricht dafür, daß die Organ-Kallikreine praktisch identisch sind.

V. Zusammenfassung

Im Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen wurden alle Lysinreste in Homoargininreste umgewandelt. Die Hemmwirkung dieses aktiven guanidinierten Inhibitorderivates gegenüber Trypsin, Pankreas- und Submandibularis-Kallikrein wurde mit der des nativen Inhibitors verglichen. Dabei zeigen der native und der guanidinier- te TK-Inhibitor gleiches hemmverhalten gegenüber Trypsin. Der gua- nidinierte Inhibitor hemmt aber Pankreas-Kallikrein um etwa 50 % schwächer als der native, während gegenüber Submandibularis-Kalli- krein die Hemmstärke beider Inhibitorderivate annähernd gleich groß ist.

Wasserunlösliche Derivate des guanidinierten TK-Inhibitors, in denen der Inhibitor an einen wasserunlöslichen polyanionischen Harzträger (CM-Cellulose) fixiert ist, binden aus wäßrigen Salz- Pufferlösungen von pH 7,8 bis 8 spezifisch Tyspin, Chymotrypsin und Kallikrein. Durch Einführung basischer Gruppen in das Harzge- rüst wird die ausschließlich negative Ladung des Trägers abge- schwächt. Diese polyamphoteren Inhibitorharze besitzen ein höheres spezifisches Bindungsvermögen für die stark negativ geladenen Kal- likreine als die polyanionischen Inhibitorharze und binden die Or- gankallikreine in für Isolierungszwecke ausreichender Menge. Der Dissoziationsgrad der wasserunlöslichen Komplexe von Trypsin und Chymotrypsin mit dem polyamphoteren Inhibitorharz ist deutlich grö- ßer als der ihrer Komplexe mit dem polyanionischen Inhibitorharz und wurde bei verschiedenen pH-Werten bestimmt.

Mit Hilfe des polyamphoteren Inhibitorharzes wurde Kallikrein aus Schweinepankreas angereichert und in relativ reiner Form erhal- ten. Durch die Einschrittmethode der Affinitätschromatographie konn- te die spezifische Aktivität des Pankreas-Kallikreins von 14,5 U/mg Einwaage auf 112 U/mg gesteigert werden. Analog wurde Kallikrein aus Submandibularisdrüsen vom Schwein reindargestellt. Die Aktivi- tät des Ausgangspräparates lag bei nur 1,75 U/mg Einwaage und be- trug nach der Affinitätschromatographie 60 U/mg, nach anschließen- der Gelchromatographie 70 U/mg.

Von dem isolierten Kallikreinpräparat aus Submandibularisdrü- sen wurde eine Aminosäureanalyse durchgeführt. Der Vergleich die- ser Analysenwerte mit der Aminosäurezusammensetzung des Pankreas- Kallikreins ergab eine auffallende Übereinstimmung.

VI. Literaturnachweis

- (1) Kraut, H., E.K.Frey und E.Werle: Z.Physiol.Chemie 189/97 (1930)
- (2) Werle, E., P.v. Roden: Biochem.Z. 286/213 (1936)
- (3) Werle, E.: Biochem.Z. 290/129 (1937)
- (4) Kraut, H., E.K.Frey, E.Werle u. F.Schultz: Z. physiol. Chemie 230/259 (1934)
- (5) Riedel, G.: Dissertation, Med.Fakultät München, 1961
- (6) Werle, E., M.M. Forell u. L.Maier: Arch. exper. Path. Pharmacol. 225/369 (1955)
- (7) Werle, E. in: M.Schachter: Polypeptides with Affect Smooth Muscles and Blood Vessels. Pergamon Press 1960, S.199
- (8) Werle, E., R.Vogel u. G.Kaliampetos: II. Weltkongreß für Gastroenterologie. München 1962.Karger, Basel, II, S.778
- (9) Trautschold, I.: Habilitationsschrift der Med. Fakultät München, 1965
- (10) Habermann, E.: Z. physiol. Chemie 328/15 (1962)
- (11) Roder, O.: Dissertation Med. Fakultät München 1967
- (12) Moriya, H.: Yakagaku zasshi 79, 1451 (1959)
- (13) Trautschold, I., H.Fritz u.E.Werle in: E.G.Erdös, N.Back u.T.Sicuteri: Hypotensive Peptides.Springer, N.York 1966
- (14) Fritz, H., I.Trautschold u. E. Werle: Z. physiol. Chemie 342/253 (1965)
- (15) Habermann, E., W. Klett: Biochem. Z. 346/133 (1966)
- (16) Werle, E., M. Grunz: Biochem. Z. 301/429 (1939)
- (17) Habermann, E. in: Neue Aspekte der Trasyololtherapie, F.K. Schattauer Verlag Stuttgart 1965, S. 129
- (18) Werle, E., R.Kehl u.K.Koebke: Biochem. Z. 320/372 (1950)
- (19) Habermann, E., W.Klett u. G.Rosenbusch: Z. physiol. Chemie 332/121 (1963)
- (20) Habermann, E., B.Müller: Arch.exper.Path.Pharmakol.253/464, 1966
- (21) Gersmeyer, E.F., H.Spitzbarth: Klin. Wschr. 39/1227 (1961)
- (22) Page, I., H.u.F. Ohnsted: Amer. J. Physiol. 201/92 (1961)
- (23) Saameli, K., T.Eskes: Fed. Proc. 21/400 (1962)
- (24) Levy, B.: J. Pharmakol. exp. Ther. 140/356 (1963)
- (25) Türker, K., B.K. Kiran, S.Kaymakalan: Arch. int. Pharmacodyn. 151/260 (1964)
- (26) Moog, E., I.Fischer: Arch.exp.Path.Pharmakol. 249/384 (1964)

- (27) Frimmer, M.: Arch. exp. Path. Pharm. 245/287 (1963)
- (28) Witte, S., K.T. Schricker, E. Schmid: Arzneimittelforschung 11/619 (1961)
- (29) Armstrong, D., C.A. Keele, I.B. Jepson u. J.W. Stewart: Nature 174/791 (1954)
- (30) Werle, E.: unveröffentlicht
- (31) Feher, P.I., F. Kalz: Dermatologica 133/190 (1966)
- (32) Habermann, E.: Arch. exper. Path. Pharmakol. 245/230 (1963)
- (33) Frey, E.K.: Langenbecks Arch. klin. Chir. 162/334 (1930)
- (34) Horton, E.W.: J. Physiol. 170/101 (1964)
- (35) Effkemann, G., E. Werle: Arch. Gyn. 171/1 (1941)
- (36) Berde, B., K. Saameli: Nature 191/83 (1961)
- (37) Diniz, C.R., I.F. Carvalho: A micromethod for determination of bradykinin under several conditions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 104/77 (1963)
- (38) Habermann, E.: Neue Aspekte der Trasyloltherapie, F.K. Schattauer Verlag Stuttgart 1969, S. 37
- (39) Webster, M.E., W.R. Clark: Am. J. Physiol. 197/406 (1959)
- (40) Werle, E.: Arch. exper. Path. Pharmakol. 245/254 (1963)
- (41) Meyer, A.: Habilitationsschrift der Med. Fakultät München 1964
- (42) Werle, E. in: Neue Aspekte der Trasyloltherapie, Schattauer, Stuttgart 1966, S. 176
- (43) Lecomte, J.: C.R. Soc. Biol. 155/1411 (1961)
- (44) Cirstea, M., G. Suhaci, I. Butculescu: Int. Arch. Allergy 26/356 (1965)
- (45) Back, N., H. Wilkens, R. Steiger: Vortrag: New York Academy of Science, Symposium on "Chemistry, Pharmacology and Clinical Application of Proteinase Inhibitors", 1966
- (46) Rocha e Silva, M.: The physiological significance of bradykinin, Ann. N.Y. Acad. Sci. 104/190 (1963)
- (47) Urbanitz, D., H. Wiegand, E. Habermann: Thermisches Odem der Rattenpfote u. Kininsystem, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path.
- (48) Lewis, G.P.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 104/236 (1963)
- (49) Webster, M.E., I. Innerfield: Enzymol. biol. clin. 5/129 (1965)
- (50) Oates, I.A., K.L. Melmon in: E.G. Erdös, N. Back, F. Sicuteri (Eds.) Hypotensive Peptides. Springer, N.York 1966, S. 565.
- (51) Habermann, E. in: Neue Aspekte der Trasyloltherapie, Schattauer Stuttgart, 1969, S. 42

- (52) Creutzfeldt, W. in: Neue Aspekte der Trasylotherapie, Schattauer, Stuttgart, 1969, S. 92.
- (53) Mason, B., E. M. Sparrow: Brit. J. Pharmacol. 25/257 (1965)
- (54) Werle, E., L. Maier, E. Ringelmann: Naturwissenschaften 39/328 (1952)
- (55) Werle, E., I. Trautschold: Ann. N. Y. Acad. Sc. 104/117 (1963)
- (56) Webster, M. E., J. V. Pierce: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 107/186 (1961)
- (57) Werle, E., B. Kaufmann-Boetsch: Naturwissenschaften 46/559 (1959)
- (58) Rocha e Silva, M.: Arch. int. Pharmacodyn. 88/271 (1951)
- (59) Werle, E., I. Trautschold: Z. Biol. 112/167 (1960)
- (60) Werle, E., L. Maier: Biochem. Z. 322/414 (1952)
- (61) Werle, E.: 27. Tagung Dtsch. Pharm. Ges., Wien 1962
- (62) Kraut, H., E. K. Frey, E. Bauer: Z. physiol. Chemie 175/97 (1928)
- (63) Werle, E.: Biochem. Z. 273/291 (1934)
- (64) Bauer, E., E. K. Frey, H. Kraut, F. Schultz, E. Werle: Naturwissenschaften 17/672 (1929)
- (65) Kraut, H., E. K. Frey, E. Werle: Z. physiol. Chem. 129/1 (1930)
- (66) Kunitz, H., J. H. Northrop: J. gen. Physiol. 19/991 (1936)
- (67) Astrup, T.: 18. Int. physiol. Congr. Copenhagen Abstr. 1950, S. 81
- (68) Werle, E., L. Maier, E. Ringelmann: Naturwissensch. 39/328 (1952)
- (69) Trautschold, I.: Vortrag Gemeinsame Tagg. der dtsch., franz. u. schweiz. Biochemie, Zürich 1960
- (70) Webster, M. E., J. V. Pierce: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 107/186 (1961)
- (71) Marx, R., P. Clemente, E. Werle, W. Appel: Blut 5/367 (1959)
- (72) Kassel, B., V. Radicevic, M. J. Ansfield, M. Laskowski: Biochem. biophys. Res. Commun. 18/255 (1965)
- (73) Anderer, F. A., S. Hörnle: J. biol. Chem. 241/1568 (1966)
- (74) Chauvet, I., G. Nouvel, R. Acher: Biochem. biophys. Acta 92/200 (1964)
- (75) Kress, L. F., M. Laskowski, sr. in: J. biol. Chem. 242/4925 (1967) 243/1758 (1968), 243/3548 (1968)
- (76) Fritz, H., H. Schult, R. Meister, E. Werle: Z. Physiol. Chem. 350/1538 (1969)
- (77) Trautschold, I., E. Werle, H. Fritz in: Neue Aspekte der Trasylotherapie, Band 1, S. 3

- (81) Fritz,H., G.Hartwich, E.Werle: Z.physiol.Chem. 345/150 (1966),
Fritz,H., I.Trautschold, E.Werle in: Bergmeyer,H.U.:
Methoden der Enzymatischen Analyse, Kap. III,3.2.6.
Verlag Chemie
- (82) Übersicht s. bei Fritz,H., Habilitationsschrift, I. Med. Fa-
kultät der Universität München, 1968
- (83) Spilberg,I., C.K.Osterland in: Neue Aspekte der Trasylol-
Therapie, Band 4, '1970
- (84) Barnhart,M.I., C.Quintana,H.L.Lenon,G.B.Bluhm,J.M.Riddle: Pro-
teases in Inflammation, Ann.N.Y.Acad.Sci. 146/527 (1968)
- (85) Haberland,G.L. in: Neue Aspekte der Trasyloltherapie,
Band 4, 1970, S. 109
- (86) Kaller,H. in: Neue Aspekte d.Tras.ther.,Band 1, S.152 (1966)
- (87) Grundmann,E. in: Neue Asp.d.Trasyl.ther.,Band 4, S.59 (1970)
- (88) Hollmann,N., H.Liesen: N.Asp.d.Tras.th.,Band 3, S.75 (1969)
- (89) Pauschinger,P., P.Matis, H.Rieckert: Neue Asp.d.Tras.ther.,
Band 3, S. 81 (1969)
- (90) Mörl,F.K.,W.Heller: N.Asp.d.Tras.ther.,Band 3, S.161 (1969)
- (91) Marx,R., P.Clemente, E.Werle, W.Appel: Blut 9/164 (1963)
- (92) Beck,E., R.Schmutzler, F.Duckert: Thrombos.Diathes.haemorrh.
(Stuttgart), 10/106 (1963)
- (93) Maki,M., F.K.Beller: Thrombos.Diathes.haemorrh. (Stuttg.),
16/668 (1966)
- (94) Marx,R.: Neue Asp.d.Trasyl.ther., Band 2, S. 89 (1968)
- (95) Blombäck,B., M.Blombäck, P.I.Olsson: Neue Aspekte der Trasy-
loltherapie, Schattauer, Band 1, S. 33, 1965
- (96) Olsson,P., S.Nordström: Thoraxchirurgie 12/176 (1964)
- (97) Meyer,A.: Neue Aspekte d.Trasyl.ther., Band 1, S. 143 (1966)
- (98) Steichele,D.F.: N.Asp.d.Trasyl.ther., Band 3, S. 207 (1969)
- (99) Ludwig,H.: Neue Asp.d.Trasyl.ther., Band 3, S. 203 (1969)
- (100) Koslowski,L.: N.Asp.d.Trasyl.ther., Band 3, S. 141 (1969)
- (101) Creutzfeldt,W.: N.Asp.d.Tras.ther., Band 3, S. 89 (1969)
- (102) Mörl,F.K.,W.Heller: N.Asp.d.Tras.ther., Band 3,S.161 (1969)
- (103) Durst,J.,W.Heller: N.Asp.d.Tras.ther., Band 4, S.157 (1970)
- (104) Matis,P.: Neue Asp.d.Trasyl.ther., Band 2, S. 19 (1968)
- (105) Hoffbauer,H.: N.Asp.d.Trasyl.ther., Band 1, S. 99 (1966)
- (106) Hoffbauer,H.: N.Asp.d.Trasyl.ther., Band 2, S. 99 (1968)
- (107) Ludwig,H.: N.Asp.d.Trasyl.ther., Band 2, S. 115 (1968)

- (108) Vorster, C.F.: N.Asp.d.Tras.ther., Band 4, S. 59 (1970)
- (109) Eisen, V., F.Bruckner: N.Asp.d.Tras.th., Band 4, S. 3 (1970)
- (110) Ohlen, H., G.Josenhans: N.Asp.d.Tras.th., Band 4, S.31 (1970)
- (111) Fritz, H., I.Eckert, E.Werle: Z.physiol.Chem. 348/1122 (1967)
- (112) Roder, O.: Dissertation, Med.Fakultät München (1967)
- (113) Feinstein, G.: Affinity Chromatography of Biological Macromolecules, unveröffentlicht
- (114) Lerman, S.: ibid. 39/232 (1953)
- (115) Arsenis, C., McCormick, D.R.: J.Biol.Chem. 239/3093 (1964)
- (116) Wilchek, M., M.Gorecki: ibid. 11/491 (1969)
- (117) Fritz, H., H.Schult, M.Neudecker, E.Werle: Angew.Chem. Intern. Ed. 5/735 (1966)
- (118) Fritz, H., H.Schult, M.Hutzel, M.Wiedemann, E.Werle: Z.Physiol. Chem. 348/308 (1967)
- (119) Fritz, H., I.Trautschold, H.Haendle, E.Werle: Annals N.Y. Acad. Sci. 146/400 (1968)
- (120) Weetall, H.H.: Biochem.J. 117/257 (1970)
- (121) Omen, G.S., D.A.Ontjes, C.B.Anfinsen: Nature (London) 225/189 (1970)
- (122) Erickson, R.P., E.Steers: Arch.Biochem.Biophys. 137/399 (1970)
- (123) Carey, W.P., J.R.E.Wells: ibid. 41/574 (1970)
- (124) Wilchek, M.: FEBS Letters 7/161 (1970)
- (125) Gillespie, D., S.Spiegelmann: J.Mol.Biol. 12/829 (1965)
- (126) Sander, E.G., D.B.McCormick, L.D.Wright: J.Chromatog. 21/419 (1966)
- (127) Fritz, H., B.Brey, M.Müller, M.Gebhardt: Proceedings of the international Conference on Proteinase Inhibitors, München, Nov. 70, de Gruyter-V. (1971)
- (128) Melrose, G.J.H.: Rev.Pure and Appl.Chem. 21/83 (1971)
- (129) Fritz, H., B.Brey, A.Schmal, E.Werle: Z.Physiol.Chem. 350/617 - 625 (1969)
- (130) Werle, E., B.Kaufmann-Boetsch: Z.Physiol.Chem. 319/52 (1960)
- (131) Werle, E., I.Trautschold: Z.Physiol.Chem. 325/48 (1961)
- (132) Frey, E.K., H.Kraut, E.Werle: Das Kallikrein-Kinin-System, F.Enke-Verlag, Stuttgart (1968)
- (133) Braunitzer, G.: Max-Planck-Institut für Biochemie, München: Kurs für Molekularbiologie, 1.Teil, 13.2. - 21.2.1970

Lebenslauf

- 1946 wurde ich, Martin Müller, am 15. September in Weilheim/Obb., als Sohn des Dr. Hans Michael Müller, ordentlicher Professor der Systematischen Theologie, und seiner Ehefrau Hanna, geb. Golte, beide evangelisch, geboren.
- 1952 - 56 Besuch der Volksschulen in Elmau bei Garmisch-Partenkirchen und Herrsching am Ammersee.
- 1957 - 66 Ausbildung und abschließende Reifeprüfung am mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Garmischer Werdenfels-Gymnasiums.
- WS 66/67 Beginn des Medizinstudiums an der Universität München.
- SS 67 Ablegung des Vorphysikums.
- SS 69 Ablegung des Physikums.
- Sept. 72 Voraussichtlicher Beginn des Staatsexamens.

